



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Sofia Ferreira dos Santos

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas, orientado pelo Professor Doutor José Barata Antunes Custódio e pelo Professor Doutor Mário João Gonçalves Roque apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Fevereiro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Sofia Ferreira dos Santos

Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas

Relatório de Estágio Curricular no âmbito do Mestrado em Análises Clínicas orientado pelo Professor Doutor José Barata Antunes Custódio e pelo Professor Doutor Mário João Gonçalves Roque e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Fevereiro de 2022

Agradecimentos

O presente relatório é o resultado de muitas horas de trabalho e teria sido impossível elaborá-lo sem a colaboração, dedicação e apoio de muitas pessoas que caminharam, lado a lado, comigo ao longo desta jornada. Posto isto não poderia deixar de expressar as minhas palavras de gratidão e apreço:

Ao Professor Doutor José Barata Antunes Custódio, pela exigência e rigor que demonstrou com este trabalho. Por partilhar comigo o seu conhecimento, por ouvir as dúvidas e por me desafiar a chegar sempre mais longe.

Ao Doutor João Mário Roque, por ter confiado em mim e no meu trabalho e por ter partilhado comigo a sua experiência profissional e conhecimentos. Agradeço-lhe por todos os desafios que me proporcionou, por me mostrar que consigo sempre chegar mais longe e por todas as palavras de motivação. O meu muito obrigado!

Aos Técnicos de Análises Clínicas e Administrativos do laboratório, por me terem acolhido, da melhor forma, desde o primeiro dia e por nunca me deixarem sentir desamparada. Agradeço-vos por confiarem em mim, por todas as conversas, por todos os conselhos e por me motivarem a crescer tanto a nível pessoal, como profissional. Foi um gosto poder trabalhar e aprender com profissionais como vocês. O meu mais sincero e profundo obrigada!

Ao Centro de Saúde Militar de Coimbra, por me fazerem sentir como um membro da vossa equipa. Pela simpatia, pelo acolhimento e pelos laços criados, o meu obrigado.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por criarem as condições ideais para a aquisição de conhecimento, por todas as pessoas que fizeram parte desta fase da minha vida e por todos os momentos que foram vivenciados de forma intensa nesta instituição.

Aos docentes do Mestrado em Análises Clínicas, por partilharem o seu conhecimento, por exigirem o máximo de nós e por estarem disponíveis sempre que necessário.

Aos meus colegas de turma, por percorrem este caminho tão intenso comigo, pelo companheirismo e pelas amizades que criei convosco.

À Ana, a minha colega de mestrado, de estágio e amiga. Agradeço-te por partilhares comigo esta experiência, por teres ouvido as minhas preocupações e eu as tuas, por todos os almoços, lanches e cafés. Obrigada, também pelo apoio incondicional que me deste ao longo deste estágio.

Aos meus amigos, por ouvirem sempre as minhas preocupações e por me mostrarem que nunca estou sozinha, mesmo quando a distância não nos permite estar juntos. Agradeço-vos muito por toda a vossa paciência e por todas as palavras de apoio e motivação

E, por último, mas não menos importante, à minha família, que sempre foi o meu porto de abrigo. Agradeço-vos por me permitirem crescer e por me proporcionarem todas as condições necessárias para eu atingir os meus sonhos. Sem o vosso apoio, nunca teria chegado aqui. Obrigada por me terem transmitido os valores certos ao longo da minha vida, por puxarem por mim e por me darem a liberdade necessária para escolher o meu caminho, mesmo que às vezes tropece nele. Amo-vos!

A todos muito obrigado!

Índice

Abreviaturas	ix
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tabelas.....	xiii
Resumo.....	xv
Abstract.....	xvii
Introdução	1
Caracterização do Laboratório de Análises Clínicas.....	2
Recursos Humanos.....	2
Estrutura do Laboratório	2
Funcionamento do laboratório	2
Atividades Desenvolvidas	3
Controlo de Qualidade.....	3
Hematologia.....	5
Hematopoiese.....	5
Eritropoiese.....	6
Eritrócitos.....	7
Mielopoiese	13
Formação dos Monócitos e Macrófagos.....	15
Linfopoiese	16
Leucócitos.....	16
Megacariopoiese.....	19
Hemograma.....	20
CELL-DYN Ruby.....	21
Parâmetros Eritrocitários.....	22
Parâmetros Leucocitários	23
Parâmetros Plaquetares.....	24
Contagem de Reticulócitos	24
Hemoglobina A_{1c}.....	25
Adams HA-8160 HbA _{1c}	25
Velocidade de Sedimentação Globular	26
Hemostase	26
Coagulação	27
Fibrinólise.....	28
Provas de Coagulação.....	28
Tempo de Protrombina (TP).....	29

Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT).....	29
Quantificação do Fibrinogénio.....	29
Imunohematologia.....	30
Sistema ABO.....	30
Sistema Rhesus (Rh).....	31
Determinação dos Grupos Sanguíneos	31
Coloração e Observação de Esfregaços de Sangue Periférico.....	32
Preparação do Esfregaço Sanguíneo	32
Coloração May-Grünwald-Giemsa	33
Observação do Esfregaço Sanguíneo.....	33
Caso Clínico 1	34
Caso Clínico 2.....	36
Bioquímica.....	38
Avaliação do Equilíbrio Hidro - Eletrolítico	38
Equilíbrio Hidro - Eletrolítico	38
Sódio (Na ⁺).....	39
Potássio (K ⁺)	41
Cloreto (Cl ⁻)	43
Determinação do Ionograma	44
Osmolaridade	44
Avaliação do Metabolismo Ósseo	45
Cálcio (Ca ²⁺)	45
Fósforo (P)	46
Magnésio (Mg ²⁺).....	47
Diagnóstico da Diabetes <i>mellitus</i> e Avaliação da Glucose	47
Glicémia	48
Diagnóstico da Diabetes <i>mellitus</i>	49
Avaliação do Metabolismo dos Lípidos.....	50
Colesterol Total.....	50
Colesterol HDL	51
Colesterol LDL.....	51
Triglicérides	52
Avaliação da Função Renal.....	52
Creatinina	53
Ureia	53
Ácido Úrico.....	54

Microalbuminúria	54
Avaliação da Função Hepática.....	55
Bilirrubina Total.....	55
Bilirrubina Direta.....	56
Bilirrubina Indireta	56
Alanina Aminotransferase (ALT)	56
Aspartato Aminotransferase (AST)	57
Fosfatase Alcalina (ALP)	57
Gama-glutamilttransferase (GGT)	58
Avaliação da Função Pancreática	58
Amilase	59
Avaliação do Metabolismo do Ferro	59
Ferro	60
Enzimas do Músculo Esquelético	60
Creatinacinaase (CK)	60
CK-MB.....	61
Lactato Desidrogenase (LDH)	61
Marcadores da Inflamação	62
Proteína C- Reativa (PCR).....	62
Caso Clínico 1	63
Caso Clínico 2	65
Caso Clínico 3	66
Imunologia.....	67
Toxicologia	67
Microbiologia.....	68
Conclusão	69
Bibliografia.....	71

Abreviaturas

ADP - Adenosina difosfato

ALP - Fosfatase alcalina

ALT - Alanina aminotransferase

APTT - Tempo de tromboplastina parcialmente ativado

AST - Aspartato aminotransferase

ATP - Adenosina trifosfato

CK - Creatinacinase

G6P - Glucose-6-fosfato

G6PDH - Glucose-6-fosfato desidrogenase

GGT - Gama-glutamyltransferase

Hb - Hemoglobina

HCT - Hematócrito

HDL - Lipoproteína de elevada densidade

HPLC - Cromatografia líquida de alta resolução

ICT - Tecnologia de chipes integrados

IDL - Lipoproteína de densidade intermédia

INR - Razão normalizada internacional

ISI - Índice de sensibilidade internacional

LDH - Lactato desidrogenase

LDL - Lipoproteína de densidade baixa

Lp(a) - Lipoproteína (a)

MAPSS - Separação por dispersão polarizada em diferentes ângulos

MCH - Concentração média de hemoglobina

MCHC - Concentração Corpuscular média de hemoglobina

MCV - Volume corpuscular médio

MPV - Volume plaquetar médio

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAI - Inibidor do ativador do plasminogénio

PCR - Proteína C Reativa

PDW - Dispersão do volume plaquetar

PTGO - Prova de tolerância à glicose oral

PTH - Hormona paratiroide

RBC - Contagem de eritrócitos

RDW - Dispersão de volume eritrocitário.

TAFI - Inibidor da fibrinólise por trombina

TFPI - Inibidor da via do fator tecidual

TPA - Ativador tecidual do plasminogénio.

TP - Tempo de Protrombina

VLDL - Lipoproteína de densidade muito baixa

VWF - Fator Von Willebrand

Lista de Figuras

Figura 1 - Fluxo das amostras do laboratório nas fases pré-analítica, analítica e pós-analítica.....	3
Figura 2 - Linhagens celulares da hematopoiese.....	6
Figura 3 - Diferentes etapas da eritropoiese.....	7
Figura 3.1 - Proeritroblasto.....	7
Figura 3.2 - Eritroblasto basófilo.....	7
Figura 3.3 - Eritroblasto policromático.....	7
Figura 3.4 - Eritroblasto ortocromático.....	7
Figura 3.5 - Reticulócitos.....	7
Figura 3.6 - Eritrócitos.....	7
Figura 4 - Estrutura do heme.....	8
Figura 5 - Esfregaço sanguíneo com presença de acantócitos.....	9
Figura 6 - Esfregaço sanguíneo com presença de células alvo.....	9
Figura 7 - Esfregaço sanguíneo com presença de células em caneta.....	9
Figura 8 - Esfregaço sanguíneo com presença de células cesto.....	10
Figura 9 - Esfregaço sanguíneo com presença de células em foice.....	10
Figura 10 - Esfregaço sanguíneo com presença de dacriócitos.....	10
Figura 11 - Esfregaço sanguíneo com presença de eliptócitos.....	10
Figura 12 - Esfregaço sanguíneo com presença de equinócitos.....	10
Figura 13 - Esfregaço sanguíneo com presença de esferócitos.....	11
Figura 14 - Esfregaço sanguíneo com presença de estomatócitos.....	11
Figura 15 - Esfregaço sanguíneo com microcitose.....	11
Figura 16 - Esfregaço sanguíneo com macrocitose.....	11
Figura 17 - Esfregaço sanguíneo com corpos de Howell- Jolly.....	12
Figura 18 - Esfregaço sanguíneo com ponteados basófilos.....	12
Figura 19 - Esfregaço sanguíneo com grânulos sideróforos.....	12
Figura 20 - Esfregaço sanguíneo com aglutinação.....	13
Figura 21 - Esfregaço sanguíneo com fenômeno de rouleaux.....	13
Figura 22 - Esfregaços sanguíneos com diferentes quantidades de hemoglobina.....	13
Figura 22.1 - Hipocromia.....	13
Figura 22.2 - Normocromia.....	13
Figura 23 - Diferentes etapas da mielopoiese.....	14
Figura 23.1 - Mieloblasto.....	14

Figura 23.2 - Promielócito.....	14
Figura 23.3 - Mielócito.....	14
Figura 23.4 - Metamielócito.....	14
Figura 23.5 - Neutrófilo em bastão.....	14
Figura 23.6 - Eosinófilo em bastão.....	14
Figura 23.7 - Basófilo em bastão.....	15
Figura 23.8 - Neutrófilo segmentado.....	15
Figura 23.9 - Eosinófilo.....	15
Figura 23.10 - Basófilo.....	15
Figura 24 - Diferentes etapas da formação dos monócitos e macrófagos.....	15
Figura 24.1 - Monoblasto.....	15
Figura 24.2 - Promonócito.....	15
Figura 24.3 - Monócito.....	16
Figura 24.4 - Macrófago.....	16
Figura 25 - Diferentes etapas da linfopoiese.....	16
Figura 25.1 - Linfoblastos.....	16
Figura 25.2 - Pró-linfócitos.....	16
Figura 25.3 - Linfócitos.....	16
Figura 26 - Diferentes etapas da megacariopoiese.....	20
Figura 26.1 - Megacarioblasto.....	20
Figura 26.2 -. Megecariócito.....	20
Figura 26.3 - Paquetas.....	20
Figura 27 - Princípio da citometria de fluxo.....	22
Figura 28 -Cascata de coagulação.....	28
Figura 29 - Contador manual de leucócitos.....	33
Figura 30 - Contagem em “zig zag”	33
Figura 31 - Esfregaço sanguíneo da paciente do Caso Clínico 1.....	34
Figura 32 - Esfregaço sanguíneo da paciente do Caso Clínico 2.....	36
Figura 33 - Esquema representativo das principais causas da hiponatrémia.....	40
Figura 34 - Esquema representativo das principais causas da hipernatrémia.....	41
Figura 35 - Esquema representativo das principais causas da hipocaliémia.....	42
Figura 36 - Esquema representativo das principais causas da hipercaliemia.....	43
Figura 37 - Equação de Nernst.....	44

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Aparelhos e técnicas desenvolvidas no setor de hematologia.....	5
Tabela 2 - Patologias associadas a alterações morfológicas dos eritrócitos.....	9
Tabela 3 - Patologias associadas a variações no tamanho dos eritrócitos.....	11
Tabela 4 - Patologias associadas a variações estruturais dos eritrócitos.....	12
Tabela 5 - Parâmetros do hemograma.....	21
Tabela 6 - Parâmetros eritrocitários e correspondentes definições, métodos/fórmulas, valores de referência e unidades.....	23
Tabela 7 - Parâmetros leucocitários e correspondentes definições, métodos/fórmulas, valores de referência e unidades.....	24
Tabela 8 - Parâmetros plaquetares e correspondentes definições, métodos/fórmulas, valores de referência e unidades.....	24
Tabela 9 - Fatores de coagulação.....	27
Tabela 10 - Grupos sanguíneos e os seus antigénios e anticorpos.....	30
Tabela 11 - Reação dos grupos sanguíneos com anticorpos A, B e D. Aglutinação indica positividade, ou seja, o sangue aglutina em contacto com o reagente. Negativo indica que o sangue não aglutina em contacto com o reagente.....	31
Tabela 12 - Hemograma da paciente do Caso Clínico 1.....	34
Tabela 13 - Hemograma da paciente do Caso Clínico 2.....	36
Tabela 14 - Resultados laboratoriais da paciente do Caso Clínico 1.....	63
Tabela 15 - Critérios para o diagnóstico de Hipercolesterolemia familiar heterozigótica segundo a MedPed e a Organização Mundial de Saúde.....	64
Tabela 16 - Resultados laboratoriais do paciente do Caso Clínico 2.....	65
Tabela 17 - Resultados laboratoriais do paciente Caso Clínico 3.....	66
Tabela 18 - Determinações do setor de imunologia.....	67

Resumo

Este relatório tem como objetivo apresentar as atividades desenvolvidas ao longo do estágio curricular do Mestrado em Análises Clínicas, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, integrando os conhecimentos adquiridos nas unidades curriculares do referido curso.

O estágio teve lugar no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, sob orientação do Dr. Mário João Roque, e decorreu durante o período de cinco meses, onde foi possível contactar com as áreas de Hematologia, Bioquímica Clínica, Imunologia, Microbiologia e Toxicologia.

No relatório será apresentada a rotina laboratorial (fase pré-analítica, analítica e pós-analítica), o sistema de qualidade, as metodologias e fundamentos dos ensaios de cada área, aprofundando as áreas de Hematologia e Bioquímica Clínica, e a interpretação laboratorial de casos clínicos.

Palavras-chave: Laboratório de Análises Clínicas, Centro de Saúde Militar de Coimbra, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Hematologia, Bioquímica Clínica.

Abstract

This report aims to present the activities developed during the curricular internship of the Master's Degree in Clinical Analysis, Faculty of Pharmacy of University of Coimbra, integrating the knowledge acquired in the curricular units of the this course.

The internship took place at the Clinical Analysis Laboratory of the Military Health Center of Coimbra, under the guidance of Dr. Mário João Roque, and took place over a period of five months, where it was possible to contact with the areas of Hematology, Clinical Biochemistry, Immunology, Microbiology and Toxicology.

The report will present the laboratory routine (pre-analytical, analytical and post-analytical phases), the quality system and the methodologies and fundamentals of the tests used in each area, inciting the areas of Hematology and Clinical Biochemistry, and the laboratory interpretation of clinical cases.

Keywords: Clinical Analysis Laboratory, Military Health Center of Coimbra, Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Hematology, Clinical Biochemistry.

Introdução

O início do interesse pelas Análises Clínicas remota ao fim do século XVIII, quando Antoine François Fourcroy sugeriu a implantação de laboratórios em hospitais para a análise química de excreções, urina e outras descargas dos doentes. A evolução do laboratório de análises clínicas decorreu em três fases principais: a fase inicial entre 1790 e 1840, a fase de institucionalização entre 1840 e 1855 e, por último, a fase de extensão que decorre desde 1855 até aos dias de hoje (1). Durante este processo, a importância das análises clínicas foi tornando-se mais evidente, sendo hoje uma área imprescindível para a confirmação de um diagnóstico, para auxílio na seleção, otimização e monitorização da terapêutica, rastreio de patologias, entre outros (2).

O Mestrado em Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra compreende várias unidades curriculares que visam a aquisição de conhecimentos de todas as áreas científicas das análises clínicas e culmina no estágio curricular no último semestre de modo a consolidar o conhecimento e adquirir experiência prática relativamente às quatro principais valências: Hematologia, Bioquímica, Imunologia e Microbiologia.

O estágio curricular decorreu ao longo de 5 meses no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra, sendo o tempo dividido pelos diversos setores do laboratório. Na primeira semana foquei-me na fase pré-analítica, mais especificamente na secretaria e colheita de amostras, seguiram-se dois meses na hematologia, dois meses na bioquímica e imunologia e as restantes três semanas foram dedicadas à microbiologia.

Caracterização do Laboratório de Análises Clínicas

O Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra distingue-se dos restantes pela sua missão. Este laboratório, assim como o Centro de Saúde Militar de Coimbra no geral, tem como principais objetivos o apoio à atividade operacional e a disponibilização de serviços de saúde à “família militar”. Sendo assim os principais utentes deste laboratório são militares operacionais, reformados e em situação de reserva e os seus familiares diretos e reformados das forças armadas (3).

Recursos Humanos

A equipa do Laboratório é constituída pelo especialista responsável Coronel Dr. Mário João Roque, Mestre em Saúde Pública e Especialista de Análises Clínicas pela Ordem dos Farmacêuticos, quatro técnicos de Análises Clínicas e Saúde Pública e uma funcionária administrativa.

Estrutura do Laboratório

O laboratório é constituído por nove divisões em dois pisos. No primeiro piso encontra-se a receção, a secretaria, a sala de colheitas, o gabinete do diretor clínico, a sala de lavagens e o laboratório de hematologia; no segundo piso estão a sala de armazenamento de reagentes e materiais, o laboratório de bioquímica e imunologia e o laboratório de microbiologia.

Funcionamento do laboratório

A análise das amostras está dividida em três fases diferentes: a fase pré-analítica, a fase analítica e a fase pós-analítica como se pode observar na Figura 1.

No momento em que o utente pretende fazer análises começa a fase pré-analítica: o utente começa por ser integrado no sistema de integração de dados, Maxdata, onde lhe é correspondido um código alfanumérico e a correspondente requisição das análises. De seguida na sala de colheitas faz-se a preparação e identificação do material necessário tendo em conta a requisição e faz-se a colheita das amostras necessárias. Por último, as amostras são distribuídas pelos diferentes setores onde são preparadas para a análise requisitada ou são enviadas para outro laboratório, no caso de não podermos realizar a análise. Na fase analítica é feita a análise dos parâmetros pretendidos nos diferentes aparelhos do laboratório. Assim que a determinação dos parâmetros termina, começa a fase pós-analítica em que os resultados são validados primeiro pelo técnico, no caso de haver de necessidade de repetir análises, e depois pelo diretor clínico e por fim dá-se a emissão e entrega dos resultados.

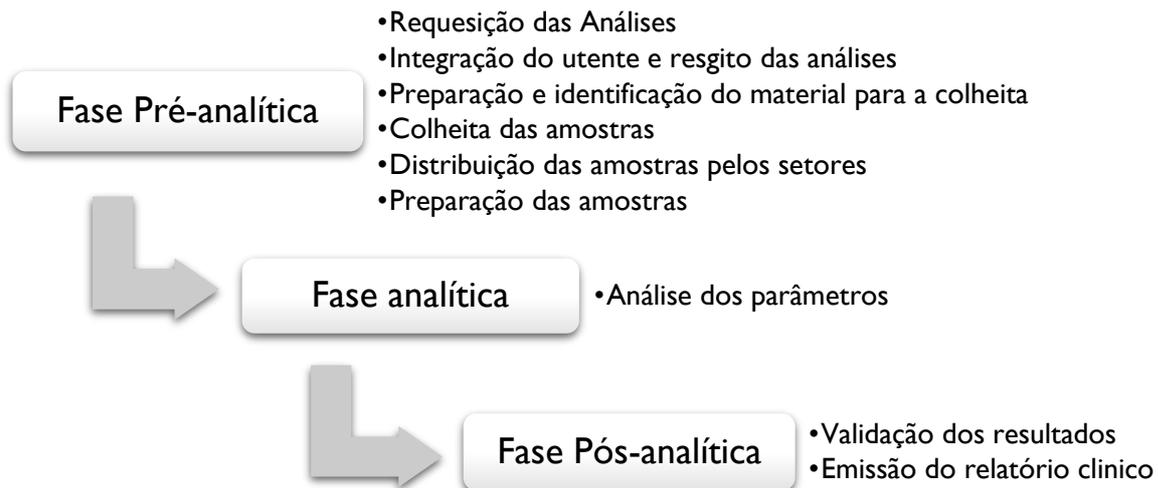


Figura I - Fluxo das amostras do laboratório nas fases pré-analítica, analítica e pós-analítica.

Atividades desenvolvidas

O estágio curricular teve uma duração de cinco meses, sendo este tempo dividido entre a fase pré-analítica e as diferentes valências (hematologia, bioquímica, imunologia e microbiologia). Durante a primeira semana foquei-me na área pré-analítica, sendo, portanto, uma experiência observacional, em que o objetivo foi entender o processo de integração dos utentes e registo das análises no sistema informático e observar colheitas.

O restante tempo de estágio foi dividido entre as valências, dois meses em Hematologia, dois meses em Bioquímica e Imunologia e três semanas em Microbiologia. Houve uma redução no tempo de estágio na Microbiologia devido ao pouco fluxo e pequena variabilidade de amostras.

Controlo de Qualidade

O controlo de qualidade do Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra abrange diversos procedimentos que permitem avaliar a qualidade dos serviços prestados através dos testes realizados e dos seus resultados. Incluídos nestes procedimentos destacam-se as manutenções, as calibrações, os controlos internos e os controlos externos.

As manutenções são feitas nos aparelhos automatizados de modo a garantir que estes se mantêm a funcionar no exponencial da sua capacidade. São divididas entre manutenções diárias, semanais, quinzenais, mensais e trimestrais, sendo que as manutenções diárias normalmente servem para limpeza do aparelho.

As calibrações normalmente são feitas quando se troca o lote dos reagentes ou após um período definido, consoante a perda de estabilidade de um reagente para determinado teste.

O controlo interno é feito através de amostras estabilizadas fornecidas por um laboratório de referência e permitem avaliar a precisão dos resultados. Normalmente inclui dois a três níveis de controlo correspondentes a um nível baixo, um intermédio e um alto com valores padronizados. O controlo interno pode ser feito diariamente ou semanalmente consoante a estabilidade dos reagentes envolvidos nos testes e os resultados obtidos deste controlo permitem ou não validar os resultados das amostras.

O controlo externo utiliza amostras provenientes do laboratório de referência internacional, RIQAS. Estas amostras permitem que estes laboratórios de referência comparem os valores padronizados, desconhecidos pelo laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra, com os valores obtidos pelo laboratório avaliando assim a exatidão dos resultados. Este controlo é feito mensalmente para cada aparelho integrado nesta avaliação e é tratado como uma amostra sendo que os resultados são enviados para estes laboratórios de referência.

Hematologia

A hematologia é a ciência que estuda a fisiologia, normal e patológica do sistema hematopoiético (4).

No laboratório de hematologia existem diferentes aparelhos que permitem analisar diversos parâmetros hematológicos, como se pode observar na Tabela I, de modo a obter informação sobre o sistema hematopoiético dos utentes, quer na normalidade quer na patologia.

Tabela I - Aparelhos e técnicas desenvolvidas no setor de hematologia.

CELL-DYN Ruby – Abbott	Hemograma
	Contagem de reticulócitos
Adams HA-8160 HbA _{1C} – Arkray	Determinação da hemoglobina A _{1C}
BD Sedi –15	Velocidade de sedimentação
Yumizen G400 – Horiba	Tempo de Protrombina
	Tempo de ativação parcial de tromboplastina
	Quantificação de fibrinogénio

Hematopoiese

A hematopoiese é o processo de produção, diferenciação e desenvolvimento das células sanguíneas. O sistema hematopoiético é constituído pela medula óssea, fígado, baço, timo e pelos nódulos linfáticos. É nestes órgãos que ocorre a produção, diferenciação e desenvolvimento das células sanguíneas que posteriormente migram para o sangue periférico (5).

Todas a células sanguíneas são provenientes de uma célula comum, a célula estaminal hematopoiética, que através de fatores locais e humorais diferencia-se em dois tipos de células diferentes, o progenitor mielóide comum ou o progenitor linfóide comum. O progenitor linfóide comum dá origem à linhagem linfocítica. O progenitor mielóide comum dá origem à linhagem eritrocitária, à linhagem trombocítica e à linhagem granulocítica. (Figura 2) (6).

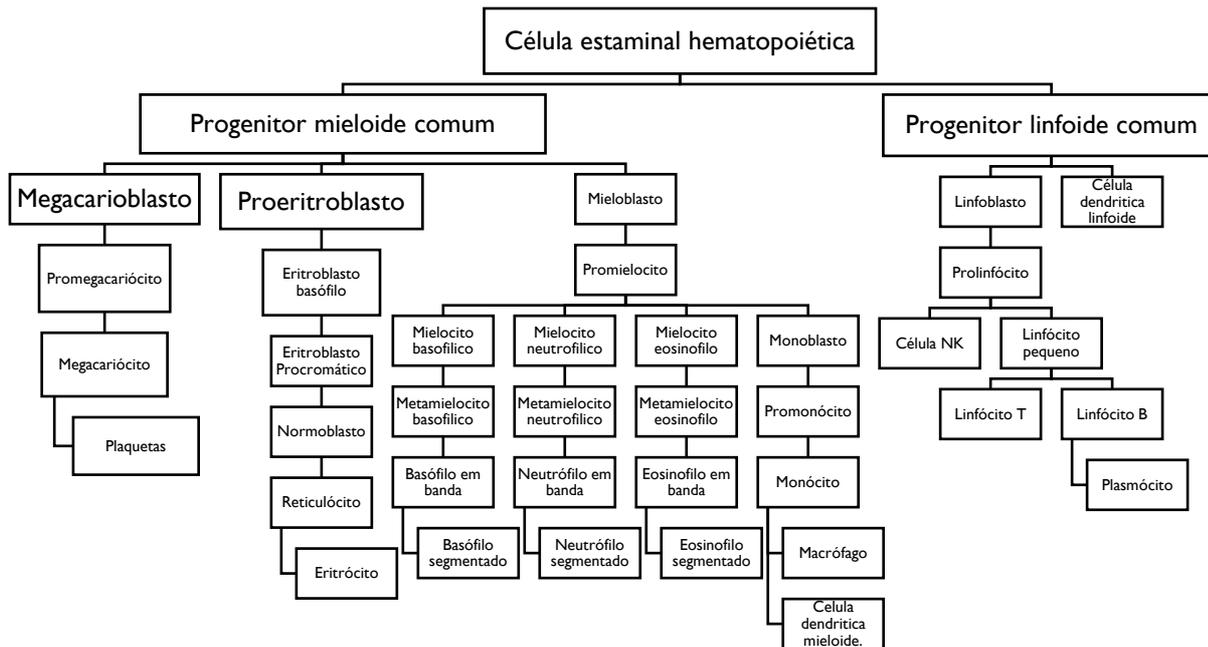


Figura 2 - Linhagens celulares da hematopoiese.

Eritropoiese

A eritropoiese é regulada principalmente pela eritropoietina, uma proteína secretada predominantemente pelas células do rim, e que tem como principal função aumentar a massa eritropoética das células progenitoras com a finalidade de aumentar a produção de hemoglobina. A secreção da eritropoietina, por sua vez, é regulada pelo sistema autócrino/parácrino, quando diminui a concentração de oxigénio no sangue aumenta a secreção de eritropoietina que vai para a corrente sanguínea até chegar à medula óssea onde estimula a eritropoiese (7).

Quando a eritropoiese é estimulada pela eritropoietina a célula estaminal hematopoiética (Figura 2) diferencia-se formando o progenitor mielóide comum que por sua vez se diferencia no proeritroblasto, a primeira célula da linhagem eritroide reconhecida na medula óssea. O proeritroblasto (Figura 3.1) começa a maturar, diminuindo o tamanho da célula e do núcleo e aumentando a concentração de hemoglobina, e passa pelas fases de eritroblasto basófilo (Figura 3.2), eritroblasto policromático (Figura 3.3), eritroblasto ortocromático (Figura 3.4) e reticulócito (Figura 3.5). O reticulócito não tem núcleo e já não consegue sintetizar hemoglobina, mas ainda apresenta ácido ribonucleico mensageiro (mRNA), este fica na medula óssea entre 1 e 2 dias e depois passa para a corrente sanguínea onde vai perder completamente o mRNA formando o eritrócito (Figura 3.6) (7).

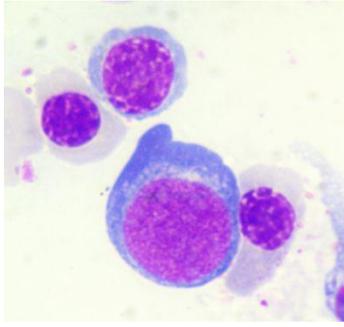


Figura 3.1 - Proeritroblasto

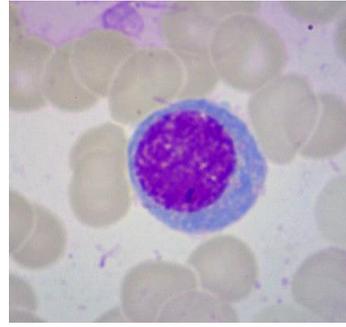


Figura 3.2 - Eritroblasto basófilo

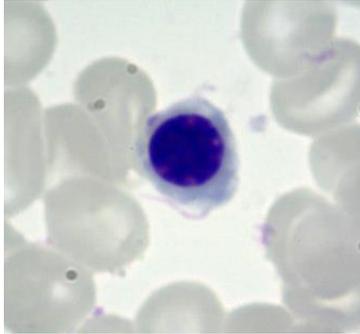


Figura 3.3 - Eritroblasto policromático



Figura 3.4 - Eritroblasto ortocromático

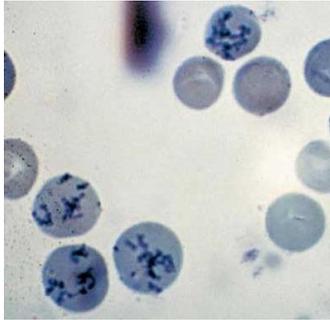


Figura 3.5 - Reticulócitos

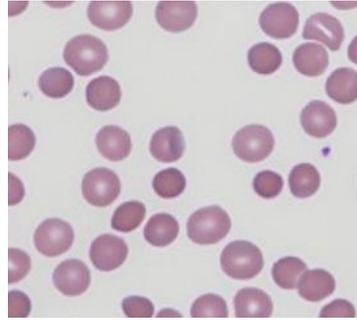


Figura 3.6 - Eritrócitos

Figura 3 - Diferentes etapas da eritropoiese.

Eritrócitos

Os eritrócitos são as células mais representadas no sangue periférico. São células anucleadas e com forma de disco bicôncavo, o que lhes permite uma maior plasticidade. O tempo médio de vida dos glóbulos vermelhos na corrente sanguínea é de 120 dias (6).

A principal função dos eritrócitos é o transporte de oxigênio para as células e por isso são as únicas células sanguíneas sem núcleo, conseguindo ligar um maior número de moléculas de oxigênio à sua principal proteína constituinte, a hemoglobina (6). Assim, os eritrócitos não têm capacidade de síntese proteica, divisão celular ou de fosforilação oxidativa e por isso a obtenção dos dois tipos de energia, a ATP e a ADPH, acontece através da via glicolítica, anaeróbia e shunt das pentoses.

A hemoglobina é uma proteína constituída por quatro subunidades, cada uma das quais constituída por um grupo heme (Figura 4) ligado a uma globulina. Cada grupo heme tem, ao

centro um íon de ferro que se liga ao oxigénio quando se encontra no estado ferroso (Fe^{2+}); assim, cada molécula de hemoglobina consegue ligar-se a quatro moléculas de oxigénio. As globulinas são cadeias polipeptídicas e podem ser de quatro tipos consoante a sua estrutura: α , β , δ , γ . A hemoglobina tem na sua constituição dois pares de globulinas, existindo três principais tipos de hemoglobinas: a hemoglobina do tipo A_1 (duas cadeias α e duas cadeias β), que é a que se encontra em maior quantidade no adulto normal, a hemoglobina F (duas cadeias α e duas cadeias γ) e a hemoglobina A_2 (duas cadeias α e duas cadeias δ) (8).

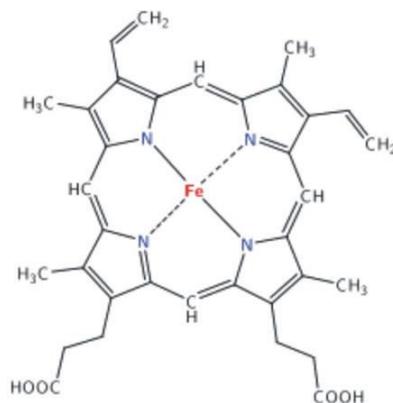


Figura 4 - Estrutura do heme.

Os eritrócitos em determinadas patologias podem sofrer diversas variações que alteram a sua funcionalidade, por isso conhecer as principais variações que ocorrem nestas células torna-se importante para chegar a um diagnóstico. Podem ocorrer variações de forma, de tamanho, estruturais ou no conteúdo de hemoglobina.

Varição de Forma

O nome dado à variação da morfologia dos eritrócitos é poiquilocitose, e esta apenas é relevante quando existe alteração de forma num número significativo de eritrócitos numa anemia normocítica pois pode indicar causas específicas de anemia.

Os acantócitos estão associados a doença hepática, hipoesplenismo, deficiência da piruvato cinase e fenótipo de McLeod (Tabela 2) (Figura 5).

As células alvo são consequência de deficiência de ferro, doença hepática, hemoglobinopatias, hipoesplenismo (Tabela 2) (Figura 6).

As células em caneta aparecem no sangue quando há deficiência de ferro (Tabela 2) (Figura 7).

As células em cesto são provocadas por hemólise excessiva (Tabela 2) (Figura 8).

As células em foice estão associadas a anemia falciforme (Tabela 2) (Figura 9).

Os dacriócitos são consequência de mielofibrose e de hematopoiese extramedular (Tabela 2) (Figura 10).

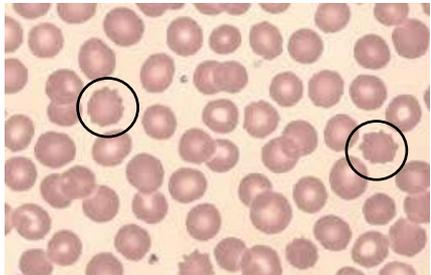
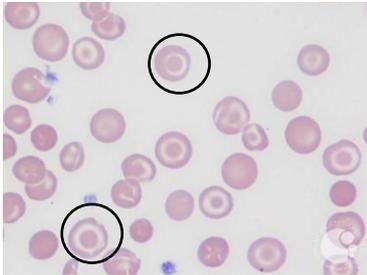
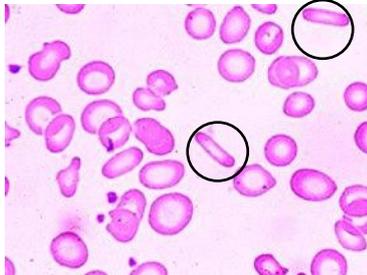
Os eliptócitos podem ser encontrados no sangue quando há eliptocitose hereditária, pós-quimioterapia, anemia megaloblástica ou deficiência de Ferro (Tabela 2) (Figura 11).

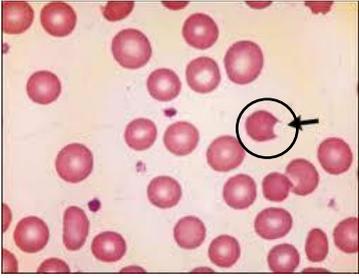
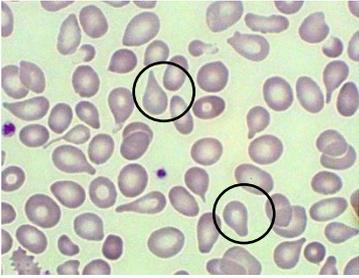
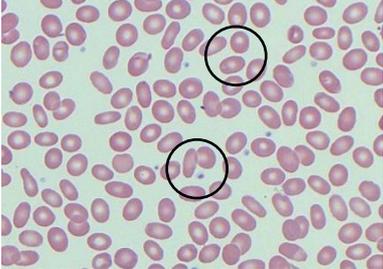
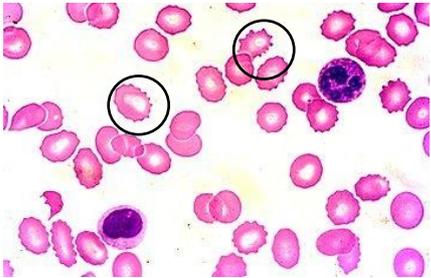
Os equinócitos são consequência de doença hepática, deficiência renal, transfusão, deficiência em fosfato, queimaduras e hipoesplenismo (Tabela 2) (Figura 12).

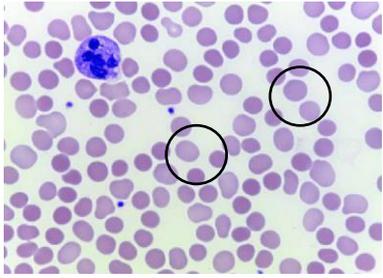
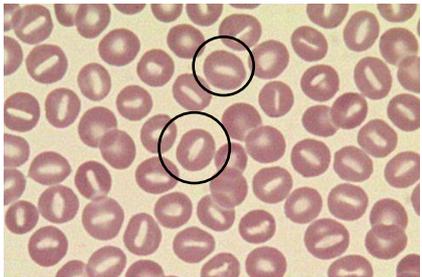
Os esferócitos são provocados por esferocitose hereditária, anemia hemolítica autoimune e septicemia (Tabela 2) (Figura 13).

Os estomatócitos estão associados a doença hepática, alcoolismo, estomatocitose hereditária e ovalocitose do Sudeste Asiático (Tabela 2) (Figura 14).

Tabela 2 - Patologias associadas a alterações morfológicas dos eritrócitos (9).

Acantócito	Doença hepática avançada; Hipoesplenismo; Algumas dislipidémias; Deficiência da piruvato cinase; Fenótipo de McLeod.	 <p>Figura 5 - Esfregaço sanguíneo com presença de acantócitos.</p>
Célula alvo	Deficiência de ferro; Doença hepática; Hemoglobinopatias; Hipoesplenismo.	 <p>Figura 6 - Esfregaço sanguíneo com presença de células alvo.</p>
Célula em caneta	Deficiência de ferro.	 <p>Figura 7 - Esfregaço sanguíneo com presença de células em caneta.</p>

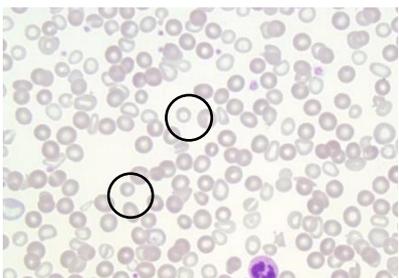
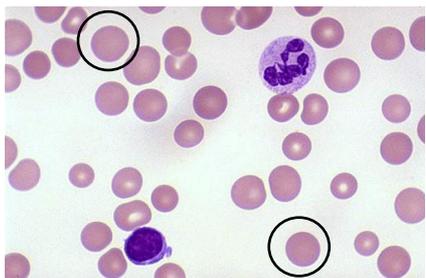
<p>Célula em cesto</p>	<p>Hemólise oxidativa. Ex: deficiência na G6PD ou instabilidade da hemoglobina.</p>	 <p>Figura 8 - Esfregaço sanguíneo com presença de células cesto.</p>
<p>Célula em foice</p>	<p>Anemia falciforme.</p>	 <p>Figura 9 - Esfregaço sanguíneo com presença de células em foice.</p>
<p>Dacriócito</p>	<p>Mielofibrose; Hematopoiese extramedular.</p>	 <p>Figura 10 - Esfregaço sanguíneo com presença de dacriócitos.</p>
<p>Eliptócito</p>	<p>Eliptocitose hereditária; Pós-quimioterapia; Anemia megaloblástica; Deficiência de Ferro.</p>	 <p>Figura 11 - Esfregaço sanguíneo com presença de eliptócitos.</p>
<p>Equinócito</p>	<p>Doença hepática; Deficiência renal; Pós-transfusão; Deficiência em fosfato; Queimaduras; Hipoesplenismo.</p>	 <p>Figura 12 - Esfregaço sanguíneo com presença de equinócitos.</p>

Esferócito	Esferocitose hereditária; Anemia hemolítica autoimune; Septicemia;	 <p>Figura 13 - Esfregaço sanguíneo com presença de esferócitos.</p>
Estomatócito	Doença hepática; Alcoolismo; Estomatocitose hereditária; Ovalocitose do Sudeste Asiático.	 <p>Figura 14 - Esfregaço sanguíneo com presença de estomatócitos.</p>

Varição do Tamanho

O nome dado à variação do tamanho dos eritrócitos (Tabela 3) é anisocitose. Quando estes se apresentam maiores do que o normal existe macrocitose (Figura 16), que é provocada por doença hepática, alcoolismo ou anemia megaloblástica; quando se apresentam menores que o normal existe microcitose (Figura 15), normalmente provocada por deficiência de ferro ou hemoglobinopatia (9).

Tabela 3 - Patologias associadas a variações no tamanho dos eritrócitos (9).

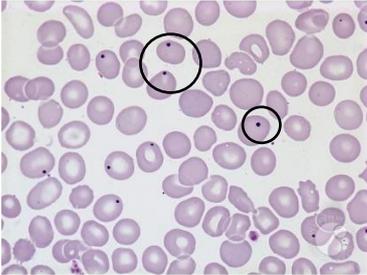
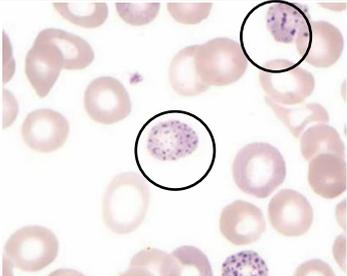
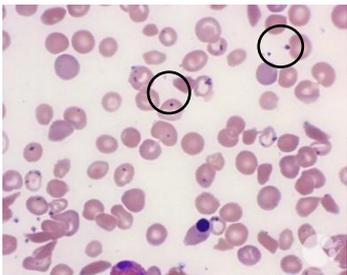
Microcitose	Deficiência de ferro; Hemoglobinopatia.	 <p>Figura 15 - Esfregaço sanguíneo com microcitose.</p>
Macrocitose	Doença hepática; Alcoolismo; Anemia megaloblástica.	 <p>Figura 16 - Esfregaço sanguíneo com macrocitose.</p>

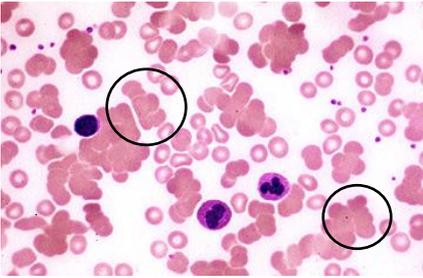
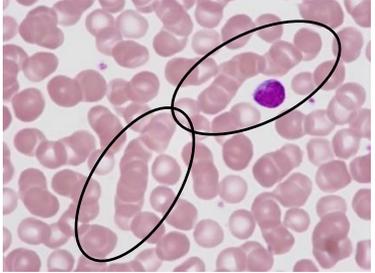
Variações Estruturais

Algumas patologias são caracterizadas não por alterar a morfologia dos eritrócitos, mas por serem detetadas estruturas características das mesmas (Tabela 4). Outras provocam alteração na distribuição dos eritrócitos (Tabela 4).

Na Tabela 4 apresentam-se as patologias associadas às diversas variações estruturais que podem ser encontradas nos eritrócitos. Os corpos de Howell-Jolly são provocados por hipoesplenismo, mielodisplasia, anemia megaloblástica, quimioterapia (Tabela 4) (Figura 17). O ponteadado basófilo é característico de hemoglobinopatia, intoxicação por chumbo, mielodisplasia, anemia hemolítica e talassemia (Tabela 4) (Figura 18). Os grânulos sideróforos são encontrados em casos de anemia sideroblástica e pós-esplenectomia (Tabela 4) (Figura 19). A aglutinação ocorre quando há aglutinina fria e anemia hemolítica autoimune fria (Tabela 4) (Figura 20). O fenômeno de rouleaux está associado à hipergamaglobulinemia (Tabela 4) (Figura 21) (9).

Tabela 4 - Patologias associadas a variações estruturais dos eritrócitos (9).

Corpo de Howell- Jolly	Hipoesplenismo; Mielodisplasia; Anemia megaloblástica; Pós-quimioterapia.	 Figura 17 - Esfregaço sanguíneo com corpos de Howell- Jolly.
Ponteadado basófilo	Hemoglobinopatia; Intoxicação por chumbo; Mielodisplasia; Anemia hemolítica; Talassemia.	 Figura 18 - Esfregaço sanguíneo com ponteadado basófilo.
Grânulos sideróforos	Anemia sideroblástica; Pós-esplenectomia.	 Figura 19 - Esfregaço sanguíneo com grânulos sideróforos.

Aglutinação	Aglutinina fria; Anemia hemolítica autoimune fria.	 <p>Figura 20 - Esfregaço sanguíneo com aglutinação.</p>
Fenómeno de rouleaux	Hipergamaglobulinémia;	 <p>Figura 21 - Esfregaço sanguíneo com fenómeno de rouleaux.</p>

Variações no Conteúdo de Hemoglobina

A hemoglobina é a proteína responsável pela cor dos eritrócitos, sendo assim a quantidade de hemoglobina presente nos eritrócitos é proporcional à cor dos mesmos. Quando a quantidade de hemoglobina nos eritrócitos está diminuída designa-se hipocromia (Figura 22.1), quando esta está normal existe normocromia (Figura 22.2) (9).

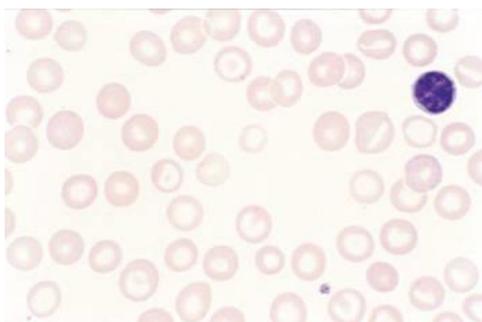


Figura 22.1 - Hipocromia



Figura 22.2 - Normocromia

Figura 22 - Esfregaços sanguíneos com diferentes quantidades de hemoglobina.

Mielopoiese

A mielopoiese é o processo de diferenciação e maturação dos granulócitos, isto é, dos neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Os granulócitos provêm do progenitor mielóide, assim como os eritrócitos, os monócitos e as plaquetas, mas o seu processo de maturação é diferente das restantes células sanguíneas (10).

Quando a mielopoiese é estimulada o progenitor mielóide é estimulado por diversos fatores de crescimento que promovem a maturação deste, fazendo com que a cromatina nuclear condense, os nucléolos desapareçam, o citoplasma aumente e torne-se mais acidófilo com granulações específicas e o tamanho celular diminui, assim como o nuclear. Na medula podem ser encontrados vários estádios de desenvolvimento desta linhagem celular. O progenitor mielóide diferencia-se formando o mieloblasto (Figura 23.1), que pelo processo de maturação vai formar o promielócito (Figura 23.2), o mielócito (Figura 23.3), o metamielócito (Figura 23.4), este último vai diferenciar-se em basófilo (Figura 23.7), neutrófilo (Figura 23.5) ou eosinófilo (Figura 23.6) em bastão que vão maturar e formar o basófilo (Figura 23.10), neutrófilo (Figura 23.8) ou eosinófilo (Figura 23.9) com núcleo segmentado.

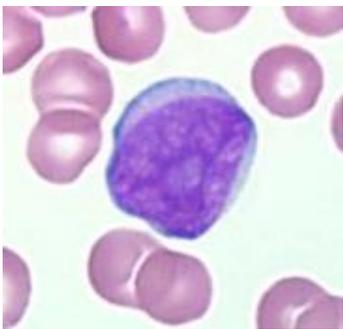


Figura 23.1 - Mieloblasto

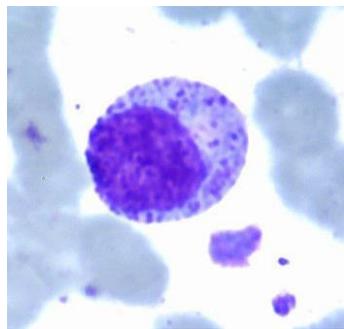


Figura 23.2 - Promielócito

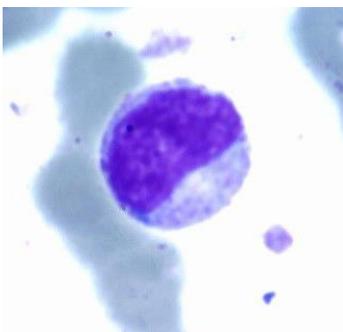


Figura 23.3 - Mielócito

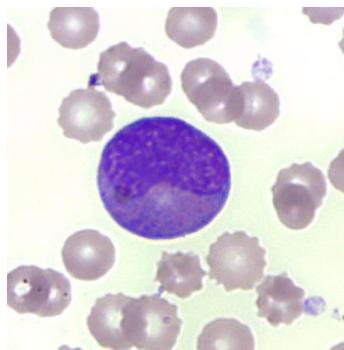


Figura 23.4 - Metamielócito



Figura 23.5 - Neutrófilo em bastão

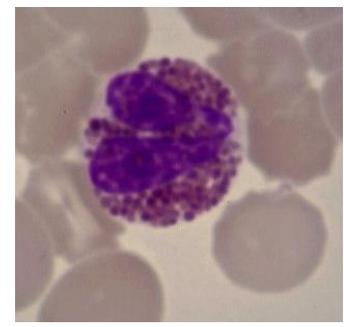


Figura 23.6 - Eosinófilo em bastão

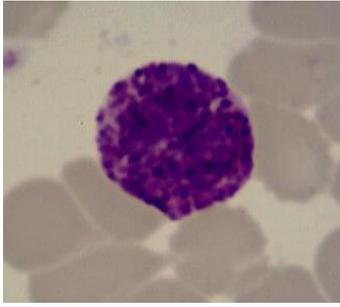


Figura 23.7 - Basófilo em bastão

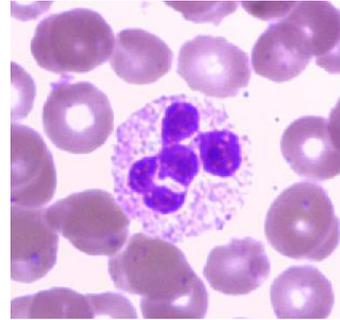


Figura 23.8 - Neutrófilo segmentado

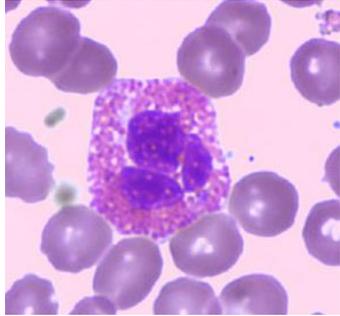


Figura 23.9 - Eosinófilo

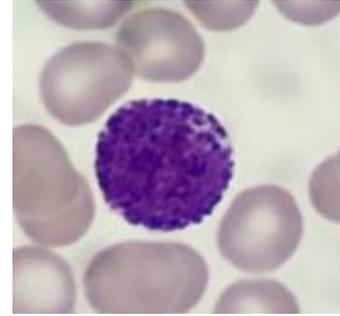


Figura 23.10 - Basófilo

Figura 23 - Diferentes etapas da mielopoiese.

Formação dos Monócitos e Macrófagos

Os monócitos são formados na medula óssea e provêm do progenitor mielóide assim como os granulócitos, eritrócitos e plaquetas, como referido anteriormente. Quando há estimulação da hematopoiese o progenitor mielóide, através de fatores de crescimento, vai diferenciar-se no monoblasto (Figura 24.1), a célula mais primitiva da linhagem monocítica, e este matura formando o promonócito (Figura 24.2) e depois o monócito (Figura 24.3), que vai para a circulação sanguínea. O monócito quando chega aos tecidos passa a denominar-se macrófago (Figura 24.4). Durante este processo o núcleo perde os nucléolos, o citoplasma torna-se basófilo e ganha grânulos e vacúolos e a célula aumenta de tamanho (10).

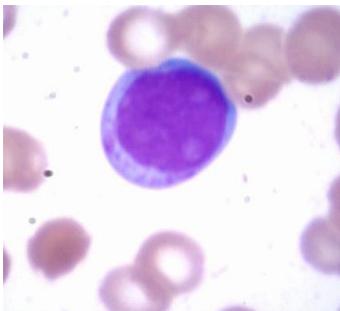


Figura 24.1 - Monoblasto

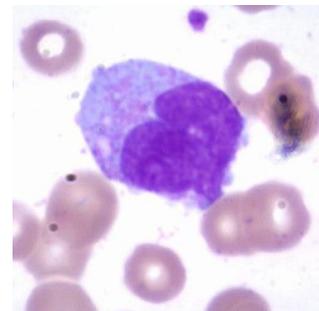


Figura 24.2 - Promonócito



Figura 24.3 - Monócito

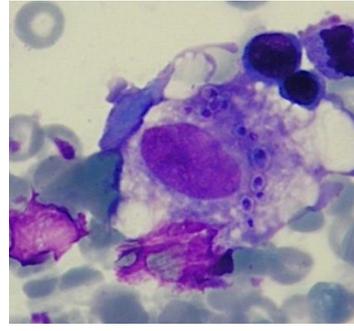


Figura 24.4 - Macrófago

Figura 24 - Diferentes etapas da formação dos monócitos e macrófagos.

Linfopoiese

A linfopoiese dá origem a quatro tipos de células sanguíneas: os linfócitos B, os linfócitos T, as células natural killer e as células dendríticas linfoides. Todas estas células provêm de um progenitor comum, o progenitor linfoide presente na medula óssea, e este pode diferenciar-se na célula dendrítica linfoide ou no linfoblasto. O linfoblasto (Figura 25.1) diferencia-se no pró-linfócito (Figura 25.2) que também pode seguir dois caminhos distintos, por um lado pode formar as células natural killer por outro lado pode formar o linfócito pequeno. O linfócito pequeno pode manter-se na medula óssea onde vai maturar formando o linfócito B imaturo ou pode migrar para o timo onde se diferencia em linfócito T CD4 ou linfócito T CD8 imaturos. Os linfócitos (Figura 25.3) apenas ficam maduros quando entram em contacto com antígenos (11).

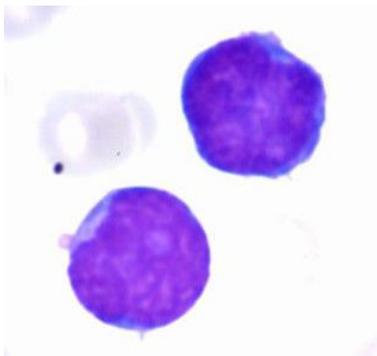


Figura 25.1 - Linfoblastos

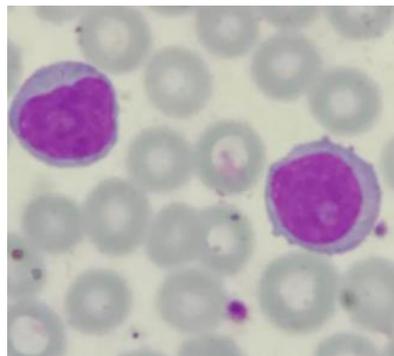


Figura 25.2 - Pró-linfócitos

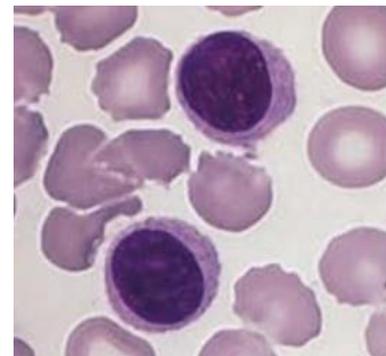


Figura 25.3 - Linfócitos

Figura 25 - Diferentes etapas da linfopoiese.

Leucócitos

Os leucócitos podem ser divididos em dois grupos distintos: os fagócitos e os imunócitos. O grupo dos fagócitos é constituído pelos granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e pelos monócitos, já o grupo dos imunócitos compreende os linfócitos, os seus

percursores e os plasmócitos. Estas células em conjunto com as imunoglobulinas e o complemento têm como função proteger o corpo contra infecções e células tumorais (12).

Neutrófilos

O neutrófilo é uma célula com um núcleo denso composto por dois a cinco lóbulos e citoplasma granuloso e acidófilo. Estes grânulos têm origem lisossomal e podem ser grânulos primários ou grânulos secundários. Os grânulos primários aparecem na fase de promielócito, sendo por isso inespecíficos, e são constituídos principalmente por fosfatase ácida, esterase, β -galactosidase e lisozima. Os grânulos secundários aparecem na fase de mielócito e permanecem na célula após a maturação da mesma, são específicos desta linhagem e são principalmente constituídos por aminopeptidase, colagenase, muramidase e lisosima. A razão entre os grânulos primários e secundários no neutrófilo é de 1 para 3 respetivamente (13).

Os neutrófilos são produzidos na medula óssea através da hematopoiese, como referido anteriormente, e quando maduros migram para a circulação sanguínea e daqui uma parte vai para a microcirculação de vários órgãos. Estes permanecem em circulação entre 6 e 10 horas e depois migram para os tecidos onde permanecem nos capilares e vénulas. Na ausência de estímulo morrem por apoptose, sendo depois fagocitados por macrófagos ao fim de três dias. Quando há um foco inflamatório, os neutrófilos em circulação migram rapidamente até ele, atravessando as paredes dos capilares, pelo espaço entre as células endoteliais, num movimento denominado diapedese e nos tecidos formam pseudópodes de modo a locomoverem-se e fazer a endocitose dos invasores (14).

A principal função deste tipo de glóbulos brancos é impedir o alojamento dos organismos patogénicos no corpo, principalmente bactérias e fungos, mas também parasitas, vírus e estruturas estranhas ao organismo, tal como células e moléculas com alterações. Esta atividade microbicida e citotóxica ocorre através da libertação de enzimas proteolíticas e produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) (14).

Em determinadas situações patológicas a quantidade de neutrófilos na circulação sanguínea pode ser alterada. Pode ocorrer neutrofilia, aumento da quantidade de neutrófilos, por administração de certos fármacos ou em infeções bacterianas. Por outro lado, pode ocorrer neutropenia, ou seja, diminuição da quantidade de neutrófilos, por administração de fármacos, por diminuição dos fatores de coagulação e consequente inibição da granulopoiese provocado por drogas citotóxicas, anemia aplásica ou causas congénitas e por destruição dos neutrófilos em situações de esplenomegalia (15).

Eosinófilos

O eosinófilo é uma célula sanguínea pertencente ao grupo dos granulócitos com o mesmo tamanho que os neutrófilos, o seu núcleo é bilobado e o citoplasma é rico em diversos tipos de grânulos. Os grânulos específicos têm propriedades tintoriais, devido aos seus núcleos cristaloides, e por isso são estes que são visualizados maioritariamente ao microscópio ótico além disso contêm hidrolases lisossomais e outras proteínas catiónicas. Os grânulos primários desenvolvem-se cedo durante a granulopoiese e encontram-se em maior número nesta célula, tendo na sua composição a proteína que forma os cristais Charcot-Leyden e que tem atividade lisofosfolipase. Os grânulos mais pequenos são compostos por arilsulfatase e outras enzimas.

Estes leucócitos assim que são libertados da medula óssea para a corrente sanguínea alojam-se nos tecidos, permanecendo menos de 1 em 100 na corrente sanguínea. Devido à sua função estes normalmente migram para tecidos expostos ao ambiente externo de modo a combaterem mais rapidamente os corpos estranhos ao organismo, especialmente nos tecidos dos tratos respiratório, gastrointestinal e geniturinário inferior.

A eosinofilia, aumento da produção de eosinófilos, está principalmente associada a infeções por parasitas helmintas e doenças alérgicas (16).

Basófilos

O basófilo é o leucócito que se encontra em menor número na corrente sanguínea. O seu núcleo possui três lóbulos e o seu citoplasma é rico em granulações específicas desta célula, que são compostas por heparina e histamina, e tem na sua superfície locais de ligação da imunoglobulina E (17).

Quando os basófilos estão maduros são libertados da medula óssea para a corrente sanguínea de onde passam para os tecidos sendo aqui denominados mastócitos.

A basofília, que define o aumento do número de basófilos na corrente sanguínea, ocorre em casos de leucemia mieloide crónica, policitemia vera, e reações imunitárias de hipersensibilidade (18).

Monócitos

O monócito é a maior célula da corrente sanguínea. Apresenta um núcleo oval ou reniforme e citoplasma basófilo com granulações finas azurófilas e vacúolos. As granulações que se observam são lisossomas que na sua composição têm fosfatase ácida e arilsulfatase.

Quando o monócito está maduro migra da medula óssea para a corrente sanguínea, onde tem tempo de vida entre 20 e 40 horas. Parte dos monócitos deslocam-se para os tecidos através dos capilares e nestes passam a denominar-se macrófagos. Tanto os monócitos

como os macrófagos possuem elevada mobilidade, pseudópodes e capacidade de fazer diapedese.

A monocitose está associada a infecções bacterianas crônicas, lúpus eritematoso, artrite reumatoide e leucemia mieloide aguda (19).

Linfócitos

O linfócito é uma célula pequena com núcleo oval ou redondo, que ocupa grande parte da célula, tem cromatina densa e membrana nuclear fina e o citoplasma é basófilo. Da linfopoiese resultam três células, das quais duas são linfócitos: as células NK, os linfócitos B e os linfócitos T. Estes dois tipos de linfócitos são morfologicamente indistinguíveis, mas são formados em locais diferentes e têm funções diferentes (20).

Os linfócitos B fazem parte da imunidade humoral, isto é, são responsáveis pela produção de anticorpos específicos. Este tipo de linfócitos matura na medula óssea e vai para a corrente sanguínea, mas continuam inativos, quando um antígeno se liga às imunoglobulinas na superfície do linfócito B ele torna-se ativo dando origem às células de memória e aos plasmócitos (21).

Os plasmócitos são células com núcleo redondo e excêntrico, com citoplasma basófilo e um halo perinuclear. A função desta célula é produzir e secretar imunoglobulinas (21).

Os linfócitos T fazem parte da imunidade celular, sendo por isso responsáveis pela apoptose das células infetadas (linfócitos T CD8+), mas também auxiliam as células da imunidade humoral através da produção de fatores parácrinos (linfócitos T CD4+). Estas células acabam a sua maturação no timo e normalmente vão para os órgãos linfóides secundários através da circulação sanguínea (22).

A linfocitose é normalmente associada a infecções virais (exemplo: mononucleose infecciosa), leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crônica e outras infecções agudas ou crônicas (20).

As células Natural Killer pertencem à linhagem linfocítica mas não descendem dos linfócitos. Morfologicamente são células grandes com grânulos no citoplasma. Estas células são recrutadas para os tecidos em casos de infecções virais, inflamações, crescimentos tumorais ou invasão onde libertam citocinas e quimiocinas inflamatórias e recrutam e ativam outros leucócitos (23).

Megacariopoiese

A megacariopoiese é o processo de formação das plaquetas.

O megacarioblasto (Figura 26.1), a primeira célula da linhagem megacariótica, é o resultado da diferenciação do progenitor mielóide quando estimulado por trombopoetina e

outros fatores de crescimento. O megacarioblasto matura formando o megacariócito (Figura 26.2). Na medula óssea o megacariócito matura, aumentando de tamanho, até o seu citoplasma se fragmentar, formando assim as plaquetas (Figura 26.3).

Assim ao longo deste processo os tamanhos das células aumentam, assim como o número de nucléolos e o citoplasma fica mais acidófilo (24).

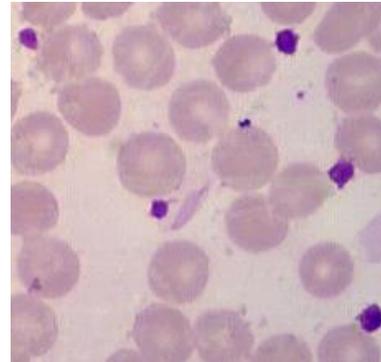
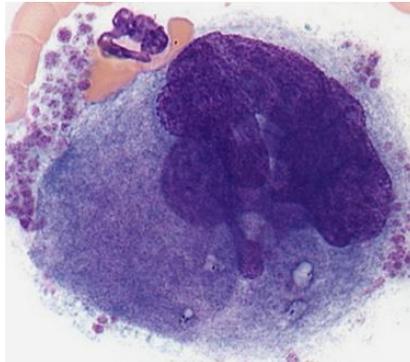
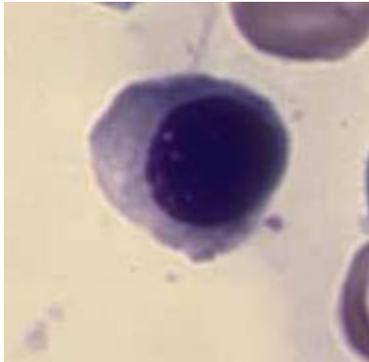


Figura 26.1 -Megacarioblasto

Figura 26.2 - Magecariócito

Figura 26.3 - Paquetas

Figura 26 - Diferentes etapas da magacariopoiесе.

Plaquetas

As plaquetas são os elementos mais pequenos do sangue humano, pois são o resultado da fragmentação do citoplasma dos megacariócitos e, conseqüentemente, não possuem núcleo. São constituídas por proteínas, lípidos, vários minerais, água e nucleótidos, conseguindo produzir aminoácidos, proteínas, ácidos gordos e fosfolípidos. O seu tempo médio de vida varia entre 9 e 12 dias na circulação periférica, sendo que as mais recentes são maiores, menos densas e mais ativas que as mais velhas.

Estes elementos celulares têm como principal função o seu papel na hemostase, mas também fazem parte da defesa imunológica inata, são moduladores da resposta inflamatória, participam na cicatrização de feridas e na metástase hematogénica (25).

Hemograma

O hemograma é uma análise que faz a contagem, determina e relaciona parâmetros hematológicos, os quais se encontram referidos na Tabela 5; além disso, inclui histogramas das populações de leucócitos, eritrócitos e plaquetas.

Tabela 5 - Parâmetros do hemograma.

Eritrócitos	Contagem de eritrócitos (RBC)
	Hemoglobina (Hb)
	Hematócrito (HCT)
	Volume Corpuscular médio (MCV)
	Concentração média de hemoglobina (MCH)
	Concentração Corpuscular média de hemoglobina (MCHC)
	Dispersão de volume eritrocitário (RDW)
Leucócitos	Contagem total de leucócitos
	Contagem de Neutrófilos
	Contagem de Linfócitos
	Contagem de Monócitos
	Contagem de Eosinófilos
	Contagem de Basófilos
Plaquetas	Plaquetas
	Volume Plaquetar médio (MPV)

CELL-DYN Ruby

No laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra o hemograma é feito com o analisador automático Cell-Dyn Ruby da Abbott Diagnostics, que também faz a contagem de reticulócitos.

O autoanalisador para o hemograma analisa as populações de eritrócitos, leucócitos e plaquetas (Tabela 5), através de citometria de fluxo, mais concretamente a tecnologia MAPSS.

A citometria de fluxo é uma técnica que permite quantificar e identificar partículas microscópicas, suspensas num meio líquido, através da dispersão da luz (Figura 27). Nesta técnica a amostra entra numa câmara de fluxo onde as células ficam alinhadas e um feixe de laser incide nelas havendo dispersão da luz. Consoante os ângulos de dispersão da luz são geradas informações sobre o tamanho, estrutura interna, granularidade e morfologia das células. A maioria dos citómetros de fluxo medem dois ângulos de dispersão: o *forward scatter*, que analisa o tamanho das células e o *side scatter*, que analisa a estrutura interna, a granularidade e a morfologia da membrana. As informações óticas são convertidas em impulsos elétricos que são armazenados e analisados pelo computador e consoante as características detetadas as células são identificadas (26).

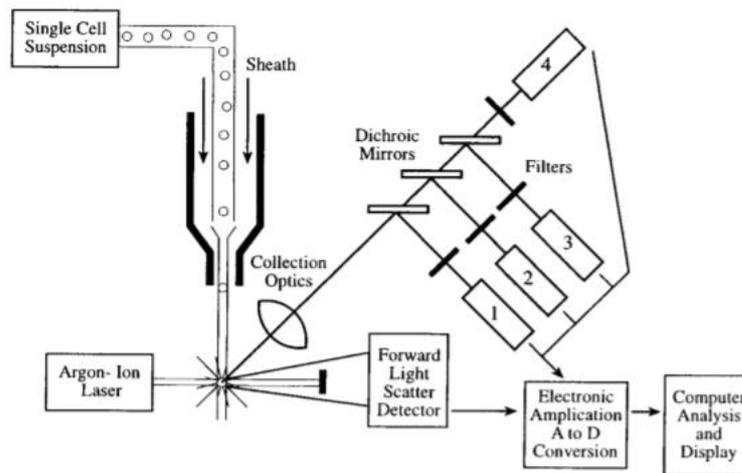


Figura 27 - Princípio da citometria de fluxo (26).

Parâmetros Eritrocitários

Os parâmetros eritrocitários são quase todos determinados a partir de citometria de fluxo ou calculados através dos valores de outros parâmetros com exceção da hemoglobina que é determinada por espectrofotometria, como podemos observar na Tabela 6.

Para determinar a hemoglobina adiciona-se ao sangue um reagente que destrói os eritrócitos libertando a hemoglobina, de seguida um feixe de LED de baixa energia com comprimento de onda de 555 nm incide na amostra e mede a absorvância, sendo esta proporcional à concentração de hemoglobina em g/dL.

As contagens e determinações eritrocitárias podem ser alteradas devido a vários fatores tais como plaquetas gigantes, que aumenta a contagem de eritrócitos, ou eritrócitos microcíticos, que diminuem a contagem de eritrócitos (26).

Tabela 6 - Parâmetros eritrocitários e correspondentes definições, métodos/formulas, valores de referência e unidades.

Parâmetro	Definição	Método /Formula	Valores de referência	Unidades
Contagem de eritrócitos (RBC)	Quantidade de eritrócitos num μL sangue.	Citometria de Fluxo	4,0-5,5	$\times 10^6/\mu\text{L}$
Hemoglobina (Hb)	Quantidade de hemoglobina num grama de sangue.	Espetrofotometria	F- 12-16 M- 13-18	g/dL
Hematócrito (HCT)	Percentagem de eritrócitos na massa de sangue após centrifugação.	$\frac{RBC \times MCV}{10}$	F- 35-47 M- 40-54	%
Volume Corpuscular médio (MCV)	Volume médio dos eritrócitos.	Citometria de Fluxo	85-95	fL
Concentração média de hemoglobina (MCH)	Quantidade média de hemoglobina em cada eritrócito.	$\left(\frac{Hb}{RBC}\right) \times 10$	27-32	pg
Concentração Corpuscular média de hemoglobina (MCHC)	Percentagem da quantidade de hemoglobina presente em cada eritrócito.	$\left(\frac{Hb}{HCT}\right) \times 100$	320-360	g/L
Dispersão de volume eritrocitário (RDW)	Percentagem de variação do volume dos eritrócitos. Índice de anisocitose.	Citometria de Fluxo		%

Parâmetros Leucocitários

Os parâmetros leucocitários determinados no hemograma são a contagem total e diferencial de leucócitos como se pode ver na Tabela 7. Para determinar estes parâmetros adiciona-se à amostra um reagente que lisa os eritrócitos e mantém a integridade dos leucócitos. No entanto, há fatores que podem afetar a contagem dos leucócitos, tais como, a presença de progenitores nucleados dos eritrócitos, a lise ineficiente dos eritrócitos e a presença de coágulos (26).

Tabela 7 - Parâmetros leucocitários e correspondentes definições, métodos/formulas, valores de referência e unidades.

Parâmetro	Definição	Método /Formula	Valores de referência	Unidades
Contagem total de leucócitos	Quantidade de leucócitos num μL de sangue.	Citometria de fluxo	4,0-11,0	$\times 10^3/\mu\text{L}$
Contagem de Neutrófilos	Quantidade de neutrófilos num μL de sangue.	Citometria de fluxo	2,5-7,5 45-70	$\times 10^3/\mu\text{L}$ %
Contagem de Linfócitos	Quantidade de linfócitos num μL de sangue.	Citometria de fluxo	1,5-3,5 20-40	$\times 10^3/\mu\text{L}$ %
Contagem de Monócitos	Quantidade de monócitos num μL de sangue.	Citometria de fluxo	0,2-0,8 3-10	$\times 10^3/\mu\text{L}$ %
Contagem de Eosinófilos	Quantidade de eosinófilos num μL de sangue.	Citometria de fluxo	0,04-0,4 1-5	$\times 10^3/\mu\text{L}$ %
Contagem de Basófilos	Quantidade de basófilos num μL de sangue.	Citometria de fluxo	0,01-0,1 0-2	$\times 10^3/\mu\text{L}$ %

Parâmetros Plaquetares

Os parâmetros plaquetares do hemograma são a contagem de plaquetas, o volume plaquetar médio e a dispersão do volume plaquetar, como descrito na tabela 8. Estes parâmetros podem estar alterados em determinadas condições tais como a agregação plaquetária, que diminui o valor da contagem de plaquetas, ou a existência de eritrócitos microcíticos, que aumenta o valor de contagem de plaquetas (26).

Tabela 8 - Parâmetros plaquetares e correspondentes definições, métodos/formulas, valores de referência e unidades.

Parâmetro	Definição	Método /Formula	Valores de referência	Unidades
Contagem de Plaquetas	Quantidade de plaquetas num μL sangue.	Citometria de fluxo	150-450	$\times 10^3/\mu\text{L}$
Volume Paquetar médio (MPV)	Volume médio das plaquetas.	Citometria de fluxo		fL
Dispersão do volume plaquetar (PDW)	Porcentagem de variação do volume das plaquetas.	Citometria de fluxo		%

Contagem de Reticulócitos

Os reticulócitos são as células de linhagem eritocitária que antecedem os eritrócitos. Estas células são anucleadas com citoplasma policromatófilo e possuem RNA precipitado no citoplasma.

Para fazer a contagem de reticulócitos adicionam-se 20 μL de sangue total em EDTA para um tubo com corante azul-de-metileno, de modo a corar as estruturas internas das células; esta mistura é analisada pelo citómetro e o valor é dado em percentagem consoante o valor de contagem de eritrócitos da mesma amostra.

Este parâmetro analítico tem elevada importância em situações de anemia pois reflete a capacidade de eritropoiese na medula óssea (26).

Hemoglobina A_{1c}

Num adulto normal existem vários tipos de hemoglobina que diferem umas das outras nas cadeias polipeptídicas. São conhecidos pelo menos três tipos de hemoglobinas: a Hb A_1 , a Hb A_2 e a HbF (27).

A hemoglobina A é a predominante nos eritrócitos, constituindo 97% da sua hemoglobina total, mas esta também apresenta diversas frações como a Hb A_1 . A hemoglobina A_1 representa 7% da hemoglobina A que circula no organismo e esta divide-se em frações. Uma das frações de hemoglobina A_1 é a hemoglobina A_{1c} (27).

A hemoglobina A_{1c} é usada como marcador de glicose no sangue em pessoas com diabetes *mellitus*, pois tem uma molécula de glicose ligada ao terminal valina de uma ou das duas cadeias β da hemoglobina que permite relacionar a quantidade de glicose ligada à hemoglobina com as concentrações de glicose no sangue num intervalo de 3 meses (tempo de vida dos eritrócitos) (28).

Adams HA-8160 HbA1C

Para determinar a hemoglobina glicada no laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra usa-se o Adams HA-8160 HbA1C da Arkray. Este autoanalisador usa a cromatografia líquida de troca catiónica em fase reversa com método colorimétrico de deteção (comprimento de onda 415 nm) (29).

A cromatografia de troca iónica baseia-se na troca de iões entre uma fase estacionária carregada, normalmente constituída por partículas de resina ou sílica e uma fase móvel com a carga contrária à fase estacionária, sendo o soluto separado consoante a sua carga iónica. Para manter a eletroneutralidade existem contraniões próximos à fase estacionária, que trocam eletrões com os solutos que estão na fase móvel. De modo a libertar os solutos da fase estacionária adiciona-se um eluente que muda o pH da fase móvel, a força iónica ou os dois (30).

Neste caso usa-se a cromatografia de troca catiónica, por isso tanto a fase estacionária como o soluto estão carregados negativamente e a fase móvel está carregada positivamente (30).

Velocidade de Sedimentação Globular

A velocidade de sedimentação globular determina a velocidade de sedimentação dos eritrócitos no plasma durante uma hora.

Este parâmetro, apesar de ainda usado, é inespecífico pois é facilmente alterado por fatores como a concentração plasmática de moléculas proteicas grandes ou o tamanho e conteúdo dos eritrócitos. É usado para o diagnóstico de patologias como a polimialgia reumática, o linfoma de Hodgkin, a policitemia vera e anemia severa e é considerado um marcador da inflamação, pois aumenta muito nas doenças inflamatórias sistémicas, neoplasias, na gravidez e no mieloma múltiplo (devido ao fenómeno de rouleaux) (31).

No laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra usa-se o aparelho Sedi-15 da Becton Dickinson que se baseia no método Westergren. O processo inicia-se com a homogeneização do sangue num tubo com citrato de sódio, de seguida a sedimentação é avaliada. Esta determinação demora aproximadamente 20 minutos, mas é convertida por um algoritmo sendo o resultado final equivalente à velocidade de sedimentação realizada pelo método convencional (60 minutos) (32).

Hemostase

A hemostase é o processo de equilíbrio entre os mecanismos procoagulantes, anticoagulantes e de fibrinólise quando ocorre lesão vascular. Este processo implica a interação entre a parede dos vasos sanguíneos, as plaquetas da circulação periférica e os fatores de coagulação. Consequentemente necessita de ser extremamente controlado de modo a evitar a coagulação excessiva (tromboses) e de modo a eliminar os coágulos após a reparação do tecido.

A hemostase está dividida em três fases: a hemostase primária, a coagulação/ hemostase secundária e a fibrinólise.

A hemostase primária começa quando se dá a lesão vascular e, consequentemente, a vasoconstrição da zona envolvente levando à diminuição do fluxo sanguíneo. As plaquetas e os fatores de coagulação são ativados por contacto havendo adesão plaquetária no tecido conjuntivo exposto mediada pelo fator Von Willebrand (VWF). O colagénio e a trombina, produzidos pelos fatores tecidulares na lesão, promovem a agregação das plaquetas para estas libertarem o conteúdo dos seus grânulos e ao mesmo tempo ativar as prostaglandinas

plaquetárias que levam à formação de tromboxano A2. O tromboxano A2 e a adenosina difosfato (ADP) promovem a contínua agregação das plaquetas da circulação sanguínea até se formar um tampão hemostático que cobre toda a área lesada. Este mecanismo tem como objetivo controlar temporariamente o sangramento (33).

Coagulação

A coagulação é iniciada quando o fator tecidual, libertado pelo tecido vascular lesado, interage com o fator VIIa formando o fator extrínseco, este vai ativar os fatores IX e X. O fator X vai formar pequenas quantidades de trombina, pois o seu cofator não está ativado. Esta via (via extrínseca) é inibida pelo inibidor da via do fator tecidual (TFPI) pois este liga-se ao fator tecidual, ao fator VIIa e ao fator X formando um complexo. A pequena quantidade de trombina que foi produzida serve para iniciar a via intrínseca, pois ativa o fator VIII e o fator V. O fator VIII e o fator IXa na presença de cálcio ativa maior quantidade de fator X que com fator Va, fosfolípidos e cálcio formam uma grande quantidade de trombina. A trombina atua sob o fibrinogénio formando monómeros de fibrina. Os monómeros de fibrina ligam-se por pontes de hidrogénio e o fator XIIIa (ativado por trombina e cálcio) estabiliza estas ligações formando ligações covalentes (33).

Tabela 9 - Fatores de coagulação (33).

Número do fator	Nome descritivo	Forma ativa
I	Fibrinogénio	Subunidade fibrina
II	Protrombina	Serina protease
III	Fator tecidual	Recetor/cofator
V	Fator lábil	Cofator
VII	Proconvertina	Serina protease
VIII	Fator antihemofílico	Cofator
IX	Fator Christmas	Serina protease
X	Fator Stuart-Prower	Serina protease
XI	Antecedente plasmático da tromboplastina	Serina protease
XII	Fator Hageman/ de contacto	Serina protease
XIII	Fator estabilizador de fibrina;Fator de Fletcher;Fator Fitzgerald.	Transglutaminase;Serina protéase;Cofator

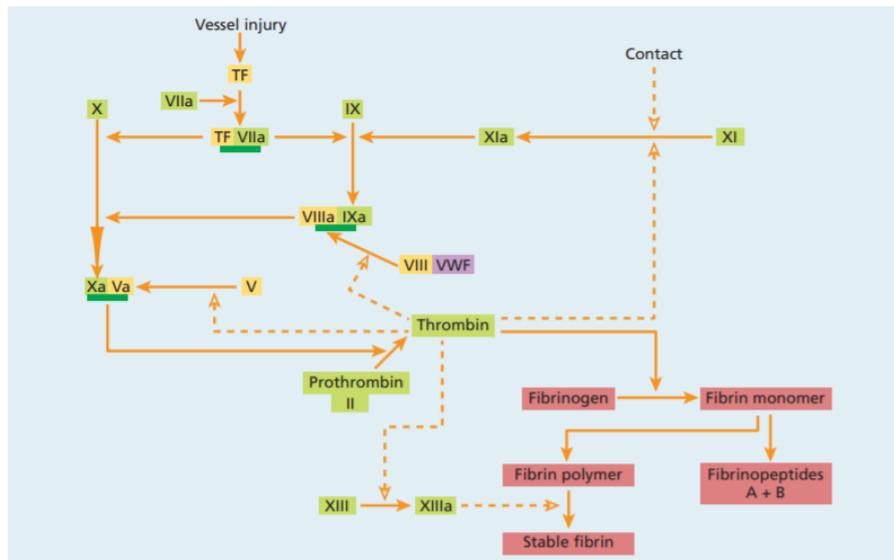


Figura 28 - Cascata de coagulação (33).

Fibrinólise

A fibrinólise é o processo de eliminação do excesso de fibrina de modo a impedir o comprometimento do fluxo sanguíneo. Neste mecanismo o plasminogénio é convertido em plasmina através de ativadores provenientes da parede vascular (via intrínseca) e dos tecidos (via extrínseca).

Este processo começa com a libertação do ativador tecidual do plasminogénio (TPA), uma serina protéase das células endoteliais, que é produzido após a Proteína C inibir os inibidores plasmáticos do TPA. O TPA liga-se à fibrina, formada por coagulação, ativando o plasminogénio e este vai formar a plasmina. A plasmina é responsável por degradar a fibrina, o fibrinogénio, o fator V e o fator VIII.

Para parar a fibrinólise é preciso inativar o TPA, inibir a ligação do plasminogénio à fibrina e inativar a plasmina circulante. Assim a trombina é libertada ativando o inibidor da fibrinólise por trombina (TAFI), que impede a ligação do plasminogénio à fibrina e consequentemente inibindo a produção de plasmina. Além disso são libertados o inibidor do ativador do plasminogénio (PAI) que inibe o TPA e α 2- antiplasmina e α 2-macroglobulina que inibem a plasmina da corrente sanguínea (33).

Provas de Coagulação

As provas de coagulação têm muita importância tanto para o diagnóstico de doenças que alteram o sistema hemostático como para o acompanhamento de terapias anticoagulantes.

No laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra determina-se o tempo de protrombina, o tempo de tromboplastina parcial ativada e faz-se a quantificação de

fibrinogénio no aparelho semiautomático Yumizen G400 da Horiba, que utiliza os métodos coagulométrico e turbidimétrico.

Tempo de Protrombina (TP)

Esta prova de coagulação tem como objetivo avaliar a via extrínseca da coagulação nomeadamente os fatores V, VII, X, a protrombina II e o fibrinogénio. Normalmente o tempo de protrombina está elevado em casos de deficiência de vitamina K, doenças hepáticas e em terapias com anticoagulantes à base de varfarina.

Para determinar o tempo de protrombina junta-se plasma em citrato de sódio e tromboplastina tecidular ou fator tecidular a uma temperatura de 37°C e adiciona-se cálcio. O resultado pode ser apresentado em segundos, em percentagem ou razão normalizada internacional (INR).

A Razão normalizada internacional é uma fórmula instituída pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de modo a padronizar o controlo do tratamento com coagulantes. Assim, o INR é a razão entre o TP da amostra e o TP do controlo elevado ao índice de sensibilidade internacional (ISI) e o seu valor de referência é entre 0,9 e 1 numa pessoa normal. O ISI é o valor de comparação entre o reagente de tromboplastina usado e a tromboplastina padrão (33).

$$INR = \left(\frac{TP \text{ amostra}}{TP \text{ controlo}} \right)^{ISI}$$

Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT)

Esta prova de coagulação tem como objetivo avaliar a via intrínseca da coagulação nomeadamente os fatores VIII, IX, XI e XII, mas também avalia os fatores V e X, a protrombina e o fibrinogénio. O APTT pode encontrar-se elevado devido a deficiência ou presença de inibidores dos fatores da via intrínseca ou em terapias anticoagulantes com heparina.

Para determinar o APTT adiciona-se ao plasma em citrato de sódio a 37°C um fosfolípido que substitui as plaquetas, cloreto de cálcio e um ativador de superfície. O resultado é dado em segundos (33).

Quantificação do Fibrinogénio

O fibrinogénio é uma globulina sintetizada no fígado que quando ativado pela trombina forma fibrina. E a sua quantificação é importante no estudo de patologias como afibrinogenemia congénita, hipofibrinogenemia, coagulação intravascular disseminada, fibrinólise e doenças hepáticas.

Para fazer a quantificação do fibrinogénio faz-se o ensaio cronométrico de Clauss. Neste ensaio adiciona-se trombina ao plasma em citrato de sódio para formar fibrina. A concentração de fibrinogénio na amostra é inversamente proporcional ao tempo necessário para formar o coágulo de fibrina. Os valores normais para este ensaio variam entre 150 e 400 mg/dL (33).

Imunohematologia

As células apresentam na sua superfície antígenos específicos, assim o sangue de cada pessoa é agrupado consoante os antígenos presentes na superfície das células sanguíneas. A tipagem do sangue consoante estes grupos tem extrema importância em casos de transfusões, transplantes e em casos de gravidez em que a mãe é Rh negativo pois previnem reações de incompatibilidade feto-materna.

No laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra faz-se a determinação dos sistemas AB0 e Rh.

Sistema AB0

O sistema AB0 trata-se de um grupo antígenos presentes na maior parte das células do organismo humano, incluindo nos eritrócitos, leucócitos e plaquetas. Estes antígenos são glicoproteínas que se distinguem uns dos outros pela diferença nos resíduos terminais de açúcar. Este grupo compreende dois antígenos diferentes: o antígeno A e o antígeno B (34).

Quando um indivíduo não tem estes antígenos ou apresenta apenas um deles desenvolve anticorpos contra os antígenos em falta, daí a importância da determinação do grupo sanguíneo do sistema AB0. Assim sendo existem quatro tipos de sangue possíveis: o tipo A, o tipo B, o tipo AB e o tipo 0. O tipo sanguíneo A apresenta apenas antígenos A e anticorpos anti-B, o tipo B apresenta apenas antígenos B e anticorpos anti-A, o tipo AB apresenta antígenos A e antígenos B e por isso não tem anticorpos, por outro lado o tipo 0 não apresenta antígenos e consequentemente tem anticorpos anti-A e anti-B (Tabela 10) (34).

Tabela 10 - Tipos sanguíneos e os seus antígenos e anticorpos.

Tipo de Sangue	Antígeno A	Antígeno B	Anticorpo anti-A	Anticorpo anti-B
A	✓	✗	✗	✓
B	✗	✓	✓	✗
AB	✓	✓	✗	✗
0	✗	✗	✓	✓

Os anticorpos de indivíduos que não possuem antígenos A ou B ou os dois normalmente são da classe IgM. Ainda assim, quando são introduzidos eritrócitos com antígenos que não estão presentes num indivíduo criam-se anticorpos contra estes antígenos, designados anticorpos imunes, que são maioritariamente IgG e que permanecem durante longos períodos de tempo e criam memória imunológica. Assim, a junção de dois tipos de sangue diferentes pode provocar reações transfusionais levando à morte (34).

Sistema Rhesus (Rh)

Este sistema é constituído por dois genes estruturais que se relacionam entre si, o gene RhD e o gene RhCE. Os dois genes codificam as glicoproteínas membranares dos antígenos D, Cc e Ee. O gene RhD codifica o antígeno D que pode estar presente ou não nas membranas dos eritrócitos conferindo um fenótipo RhD positivo ou RhD negativo nos eritrócitos.

O antígeno D é o antígeno deste sistema com maior importância clínica pois indivíduos RhD negativos quando em contacto com eritrócitos com antígeno D criam anticorpos anti-D levando a incompatibilidade sanguínea. O exemplo mais comum na clínica é gravidas RhD negativas que são expostas a células sanguíneas fetais com antígeno D e entram em incompatibilidade sanguínea (34).

Determinação dos Grupos Sanguíneos

No laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra a determinação dos grupos sanguíneos é feita através da prova celular, que consiste em adicionar reagentes com os anticorpos anti-A, anti-B e anti-D ao sangue e observar se existe aglutinação. Se o sangue aglutinar com algum dos reagentes é porque o sangue tem os antígenos correspondentes como indicado na Tabela II (34).

Tabela II - Reação dos grupos sanguíneos aos reagentes com anticorpos A, B e D. Coagulação indica positividade, o sangue coagula em contacto com o reagente. Negativo indica que o sangue não coagula em contacto com o reagente (34).

Grupo sanguíneo	Anti-A	Anti-B	Anti-D
A+	Aglutinação	Negativo	Aglutinação
A-	Aglutinação	Negativo	Negativo
B+	Negativo	Aglutinação	Aglutinação
B-	Negativo	Aglutinação	Negativo
AB+	Aglutinação	Aglutinação	Aglutinação
AB-	Aglutinação	Aglutinação	Negativo
0+	Negativo	Negativo	Aglutinação
0-	Negativo	Negativo	Negativo

Coloração e Observação de Esfregaços de Sangue Periférico

A observação de esfregaços de sangue tem extrema importância pois permite confirmar os dados fornecidos pelo hemograma e permite muitas vezes obter dados para diagnosticar patologias. Na observação destes esfregaços quantifica-se e avalia-se a morfologia das células sanguíneas (35).

No laboratório da CSMC apenas são preparadas lâminas quando existe um pedido do estudo morfológico do sangue por parte dos médicos ou se o hemograma obedecer a pelo menos um dos seguintes critérios:

- Inversão de fórmula igual ou superior a 10%;
- Qualquer inversão de fórmula, quando os leucócitos são superiores a $8 \times 10^3/\mu\text{L}$;
- Monócitos superiores a 15%;
- Basófilos superiores a 2%;
- RDW superior a 15;
- RDW superior a 14 se as constantes eritrocitárias estiverem alteradas;
- Plaquetas inferiores a $150 \times 10^3/\mu\text{L}$;
- Hemoglobina inferior a 12 g/dL nos homens e 11 g/dL nas mulheres;
- Outras situações nomeadamente, alarmes do aparelho ou leucocitoses elevadas.

Preparação do Esfregaço Sanguíneo

A preparação do esfregaço sanguíneo é uma técnica que requer cuidado e prática pois é crucial para uma boa observação das células sanguíneas, sendo assim é importante fazer dois esfregaços de sangue para a mesma amostra.

Para preparar um esfregaço sanguíneo:

1. Usa-se uma lâmina devidamente limpa e uma lamela ou lâmina para permitir uma melhor distribuição da amostra pela lâmina.
2. Coloca-se uma pequena gota de sangue no eixo central da lâmina a cerca de 1 cm de uma das suas extremidades.
3. Coloca-se a extremidade da lamela ou da segunda lâmina em contacto com a primeira lâmina, que deve estar apoiada numa superfície horizontal, um pouco à frente da gota de sangue, criando um ângulo de 30° a 40° entre as duas.
4. Faz-se retroceder a lâmina ou lamela até que entre em contacto com a gota de sangue e este flua rapidamente por todo o comprimento da zona de contacto entre as duas lâminas.

5. Faz-se avançar a lâmina ou lamela rapidamente ao longo de todo o comprimento da lâmina horizontal.
6. O esfregaço seca rapidamente ao ar, procedendo-se seguidamente à coloração do mesmo (35).

Coloração May-Grünwald-Giemsa

No laboratório do CSMC utiliza-se a coloração de May-Grünwald-Giemsa para os esfregaços sanguíneos, embora também se possa usar a coloração de Wright.

Para fazer esta coloração o primeiro passo é fazer a solução corante. Esta solução consiste na junção de uma parte de corante Giemsa, duas partes de corante May-Grünwald e três partes de água tamponada. Esta solução deve ser preparada todos os dias.

Para fazer a coloração propriamente dita devemos primeiro cobrir a lâmina com metanol e aguardar 3 minutos, de seguida removemos o metanol e cobrimos a lâmina com a solução corante e esperamos 2 minutos, por fim lavamos a lâmina com água destilada e deixamos secar ao ar (35).

Observação do Esfregaço Sanguíneo

Após a lâmina estar seca pode observar-se ao microscópio ótico. Para avaliar as células sanguíneas usa-se a objetiva 100x com óleo de imersão.

Na observação ao microscópio analisa-se a morfologia dos eritrócitos e das plaquetas, verificamos se existem agregados plaquetares e fazemos a fórmula leucocitária consoante a informação do hemograma.

A fórmula leucocitária consiste na contagem diferencial dos leucócitos no esfregaço sanguíneo usando um contador manual (Figura 29). Devem-se contar entre 100 e 200 leucócitos no terminal da lâmina, a cauda, mas numa zona em que não haja aglutinação dos eritrócitos. Além disso deve-se fazer a contagem em “zig-zag” de modo a não contar a mesmas células duas vezes como se pode ver na Figura 30.



Figura 29 - Contador manual de leucócitos.

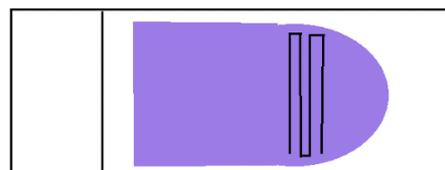


Figura 30 - Contagem em “zig zag”.

Caso Clínico I

Uma mulher de 17 anos apresenta os seguintes resultados laboratoriais:

Tabela 12 - Hemograma da paciente do Caso Clínico I.

HEMOGRAMA				
Eritrograma				
Eritrócitos		5,08	$\times 10^{12}/L$	4.00-5.20
Hemoglobina		10,5	g/dL	12-16
Hematócrito		35,0	%	38-52
VGM		69	fL	80-99
HGM		20,7	pg	27.0-33.0
CHGM		300	g/L	300-360
RDW		14,0	%	<15.0
Trombocitograma				
Plaquetas		254	$\times 10^9/L$	150-400
VPM		10,4	fL	7.0-13.0
PDW		20,0	fL	9.0-17.0
Leucograma				
Leucócitos Totais		6,21	$\times 10^9/L$	4-10
Neutrófilos Segmentados	54,6 %	3,39	$\times 10^9/L$	1.8-7.6 $\times 10^9/L$
Eosinófilos	0,5 %	0,03	$\times 10^9/L$	0.04-0.5 $\times 10^9/L$
Basófilos	1,3 %	0,08	$\times 10^9/L$	0.01-0.1 $\times 10^9/L$
Linfócitos	37,8 %	2,35	$\times 10^9/L$	1.2-4 $\times 10^9/L$
Monócitos	5,8 %	0,36	$\times 10^9/L$	0.2-1 $\times 10^9/L$

Apresenta os parâmetros eritrocitários alterados. A hemoglobina, o hematócrito, o volume globular médio e a hemoglobina globular média estão diminuídos.

Como a hemoglobina é inferior a 11 g/dL faz-se o esfregaço sanguíneo para observar ao microscópio.

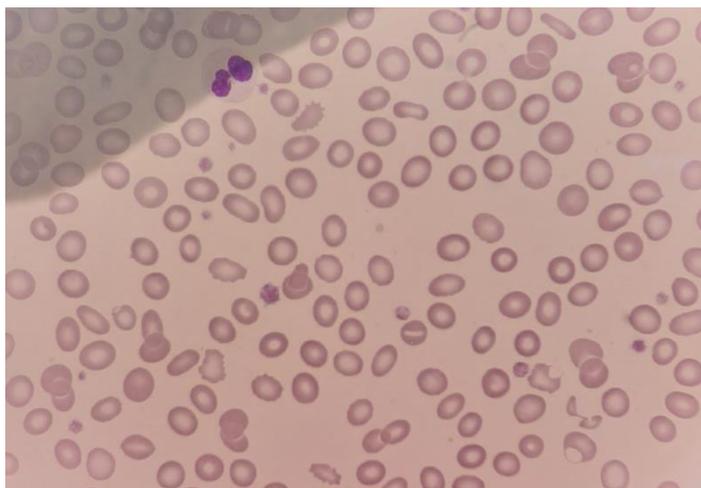


Figura 31 - Esfregaço sanguíneo da paciente do Caso Clínico I.

Como se pode observar na Figura 31, o esfregaço apresenta anisocitose e poiquilocitose com predominância de eliptócitos e anisocromia.

Por se tratar de uma anemia microcítica podemos colocar em hipótese:

- Anemia por deficiência de ferro;
- Anemia sideroblástica congênita;
- Anemia das doenças crônicas;
- Talassemia ou outras hemoglobinopatias.

Os valores relacionados com o metabolismo do ferro (ferro, ferritina e transferrina) encontram-se dentro dos parâmetros normais, por isso mandou-se o sangue para outro laboratório para fazer o perfil eletroforético da hemoglobina.

Revelou-se que a mulher de 17 anos têm Talassemia.

A talassemia é a causa de anemia hereditária mais comum no mundo. Esta patologia é caracterizada pela diminuição da produção ou pela não produção das globulinas alfa ou beta que constituem a hemoglobina (36).

A talassemia pode ser α -Talassemia ou β -Talassemia consoante a globulina que não é produzida. Na α -Talassemia as globulinas afetadas são as globulinas α e na β -Talassemia são as globulinas β (36).

A β -talassemia divide-se em β -Talassemia minor ou heterozigota, β -Talassemia major ou homozigota e Talassémia intermédia. Na β -Talassémia minor apenas um dos genes β do cromossoma II é afetado e conseqüentemente não apresenta significado clínico. Na β -Talassémia major ambos os genes β estão afetados e nenhum dos dois é silenciado pelo que no primeiro ano de vida, quando a síntese de hemoglobina fetal (HbF) diminui há anemia hemolítica severa por precipitação das globulinas α nos eritrócitos, que leva à estimulação da eritropoiese e à absorção de ferro a nível intestinal que combinado com o ferro acumulado proveniente das transfusões de sangue vai provocar doença hepática, complicações endócrinas e cardiomiopatia induzida por ferro podendo levar à morte. A talassemia intermédia apresenta ambos os genes β mas pelo menos um deles é silenciado pelo que as características hematológicas são normais (quando os dois genes são silenciados) ou apresentam formas leves de talassémia (quando um dos genes é silenciado) (36).

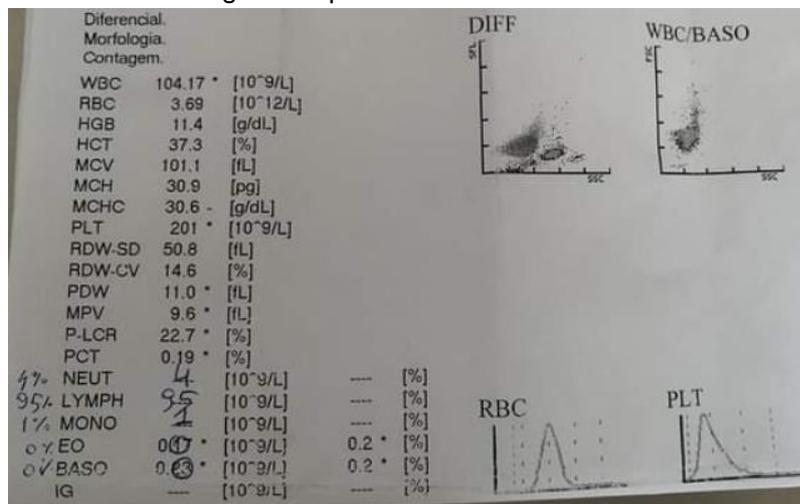
O gene α está presente em vários tipos de hemoglobina como a HbA, a HbF e HbA₂ e ao contrário do gene β existem quatro genes α . Assim pode dividir-se em quatro tipos consoante os genes afetados: dois estados de portador, a doença da hemoglobina H e a hidrópsia fetal. O estado portador ocorre por deleção de apenas um dos quatro genes α e conseqüentemente os indivíduos com esta condição normalmente não apresentam alterações fenotípicas. Quando há deleção de dois genes ocorre anemia ligeira, hipocrômica e microcítica mas a HbA₂ e a Hb F apresentam valores normais. A doença da hemoglobina H caracteriza-se por apenas um gene α ser funcional, conseqüentemente há excesso de globulinas β que

formam tetrâmeros, a hemoglobina H, que por ser instável precipita nos glóbulos vermelhos provocando aumento do baço (os glóbulos vermelhos são destruídos no baço), anemia hemolítica microcítica e hipocrômica, icterícia e deformação óssea. A hidropisia fetal ou α -talassemia major é a variante mais grave das talassemias, nesta nenhum dos genes α é funcional e conseqüentemente não há produção de globulinas α e não há produção de hemoglobina fetal nem hemoglobina A, esta condição é incompatível com a vida e os fetos são natimortos ou morrem após o parto (37).

Caso Clínico 2

Uma mulher de 48 anos.

Tabela 13 - Hemograma da paciente do Caso Clínico 2.



Os parâmetros leucocitários estão alterados, os leucócitos totais estão muito aumentados e existe uma alteração de fórmula significativa pelo que é necessário fazer um esfregaço sanguíneo.

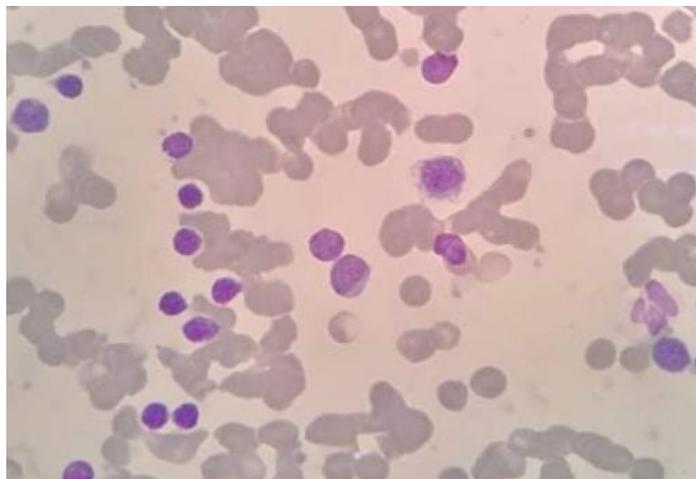


Figura 32 - Esfregaço sanguíneo da paciente do Caso Clínico 2.

Como se observar na Figura 32 o esfregaço está de acordo com o hemograma. Existe linfocitose e podem observa-se manchas de Gumprecht que são características da Leucemia Linfocítica Crónica (LLC).

A LLC é uma patologia neoplásica de linfócitos B que se acumulam no sangue periférico, medula óssea, nódulos linfáticos e baço. Começa por ser uma expansão policlonal de linfócitos B CD5 que, por influência de agentes mutacionais, transforma-se em proliferação monoclonal e que, por inibição da apoptose, faz com que estes se acumulem (38).

As principais características desta patologia em doentes sintomáticos são adenopatias generalizadas, fadiga e perda de peso. Para indivíduos assintomáticos o mais comum é linfadenopatias, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia e trombocitopenia (38).

Bioquímica

No Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra o setor de bioquímica partilha o mesmo espaço que os setores de imunologia e toxicologia, pois todas as metodologias destes setores são executadas no mesmo aparelho, o Architect ci8200 da Abbott Diagnostics. Este equipamento está dividido em dois módulos, um para bioquímica e outro para imunologia.

De seguida são apresentadas as tarefas realizadas neste laboratório e os seus fundamentos.

Avaliação do Equilíbrio Hidro - Eletrolítico

A manutenção da homeostase da água é indispensável à vida. No ser humano a manutenção da pressão osmótica e distribuição da água nos diferentes compartimentos do corpo são maioritariamente regulados por quatro eletrólitos: o sódio (Na^+), o potássio (K^+), o cloreto (Cl^-) e o bicarbonato (HCO_3^-). Este grupo de eletrólitos tem como função manter o pH, participar nas reações de oxidação-redução e como cofatores de diversas enzimas, para além da, já referida, manutenção da homeostase (39).

Os eletrólitos interferem em quase todos os processos metabólicos e por isso o seu desequilíbrio é muitas vezes a causa ou consequência de diversas patologias. Assim, a determinação da concentração dos eletrólitos é essencial para a interpretação da osmolaridade e de valores ácido-base anormais (39).

Equilíbrio Hidro - Eletrolítico

O equilíbrio hidro- eletrolítico tem como principal objetivo manter a distribuição de fluidos equilibrada, como foi referido anteriormente (40).

A água do corpo humano está distribuída entre o compartimento intracelular e o compartimento extracelular que estão separados pela membrana citoplasmática e o compartimento extracelular é dividido em dois sub-compartimentos: o compartimento intersticial e o compartimento intravascular, que estão separados pelas células endoteliais (40).

O fluido intracelular tem uma composição variável dependendo da função das células, mas os seus principais componentes são água, proteínas, potássio e magnésio e é o fluido com maior percentagem de água do corpo (40).

O plasma é constituído principalmente por água, sódio, cloreto, bicarbonato e contém proteínas (40).

O fluido intersticial é um ultrafiltrado do plasma pois as células endoteliais atuam como uma membrana semipermeável que permite a passagem de água e eletrólitos, mas impede a

passagem de moléculas com elevada massa molecular como as proteínas. Assim sendo, a sua composição é idêntica à do plasma, mas não contém proteínas (40).

O plasma e o fluido intersticial são idênticos na sua composição, mas diferem bastante do fluido intracelular. Esta diferença é devida ao transporte ativo e passivo dos iões. O sódio é transportado ativamente para o meio extracelular, devido ao gradiente eletroquímico, através da bomba Na^+/K^+ -ATPase e, conseqüentemente, o potássio vai para o meio intracelular; na membrana também há a troca iónica entre o Na^+ e o H^+ para que o ião hidrogénio saia do meio intracelular para o meio extracelular de modo a manter o pH e o volume celular (40).

Sódio (Na^+)

O sódio é o eletrólito presente em maior concentração no líquido extracelular, sendo por isso responsável por quase metade da força osmótica do plasma e, conseqüentemente, pela manutenção da distribuição normal da água e pela pressão osmótica do líquido extracelular (39).

Diariamente são absorvidas 8 a 15g de NaCl no trato gastrointestinal, mas o corpo não necessita de toda a quantidade de sal absorvida pelo que o excedente é eliminado a nível renal. Nos rins o Na^+ é filtrado nos glomérulos, mas grande parte é reabsorvido ativamente nos túbulos proximais e na ansa de Henle em conjunto com o Cl^- e a água, que vai sempre para o compartimento com maior osmolaridade. Nos túbulos distais, quando há estimulação dos sistemas de troca Na^+/K^+ e Na^+/H^+ pela aldosterona, o Na^+ é reabsorvido diretamente para manter a eletroneutralidade e o Cl^- acompanha o sódio (39). A aldosterona é secretada através do sistema renina- angiotensina- aldosterona que é ativado quando existe diminuição da pressão sanguínea no sistema justaglomerular ativando os grânulos de renina presentes nas células justaglomerulares e, conseqüentemente, estimulando a secreção de angiotensina II que promove a libertação de aldosterona e a vasoconstrição (40).

A alteração da homeostase do sódio é provocada por desequilíbrios do Na^+ ou por desequilíbrios da água, pois estes estão estritamente relacionados. As patologias associadas ao desequilíbrio do sódio são designadas por hiponatrémias, quando a concentração plasmática de sódio diminui, e hipernatrémias, quando a concentração plasmática de sódio aumenta (40).

A hiponatrémia pode estar associada ao plasma hiposmótico, isosmótico ou hiperosmótico. Na Figura 33 podem observar-se as diferentes causas da hiponatrémia, nomeadamente insuficiência renal, insuficiência cardíaca congestiva, cirrose, síndrome nefrótica, uso excessivo de diuréticos, deficiência mineralocorticoide, alcalose metabólica,

acidose tubular, rim poliquestico, nefrite intersticial cr3nica, obstru33o renal, v3mitos e diarreia e queimaduras e sudorese (40).

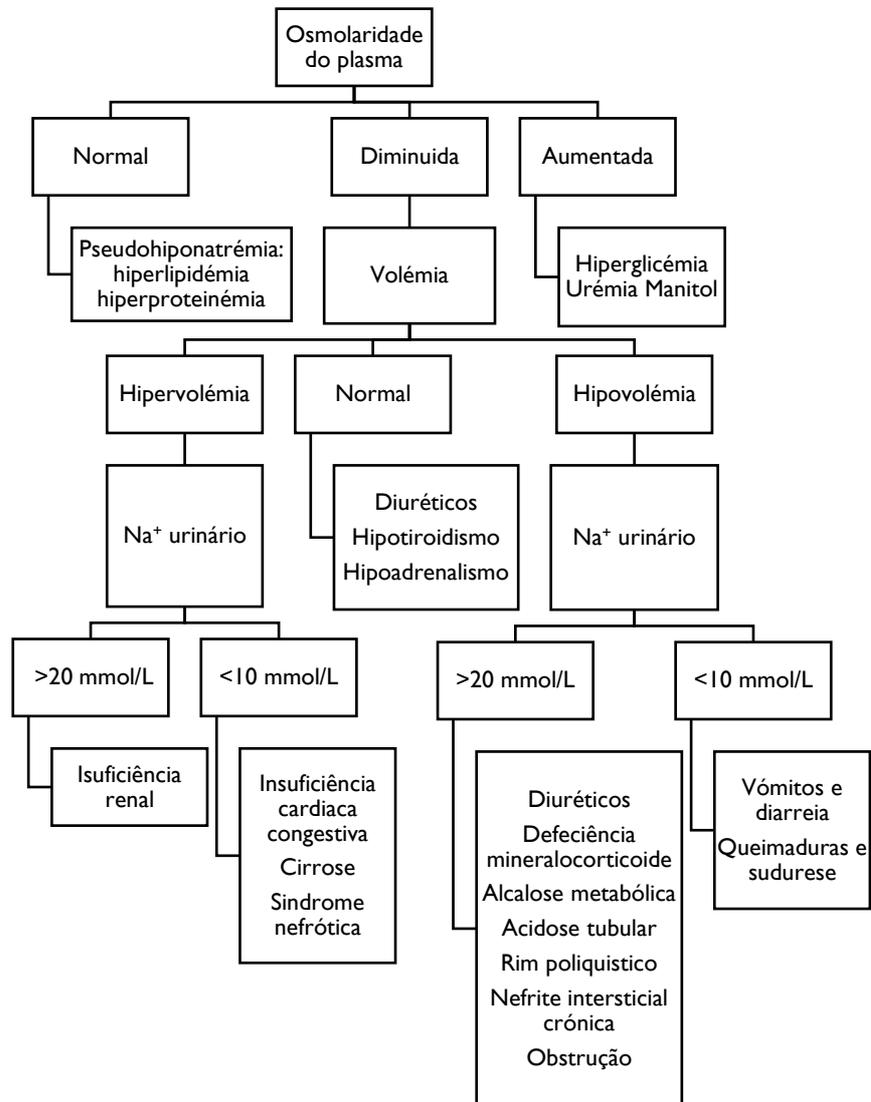


Figura 33 - Esquema representativo das principais causas da hiponatremia (40).

A hipernatremia, ao contr3rio da hiponatremia, 3 sempre hiperosmolar, ou seja, est3 associada a hipovolemia ou volemia normal. Na Figura 34 podem observar-se as diferentes causas de hipernatremia, nomeadamente hiperaldosteronismo, s3ndrome de Cushing, terapia com fluido intravenoso hipert3nico, diabetes *insipidus*, perda de s3dio pelos pulm3es ou pele, diurese osm3tica, terapia diur3tica com pouca ingest3o de 3gua, perda gatrointestinal com pouca ingest3o de 3gua e perda pela pele e pouca ingest3o de 3gua (40).

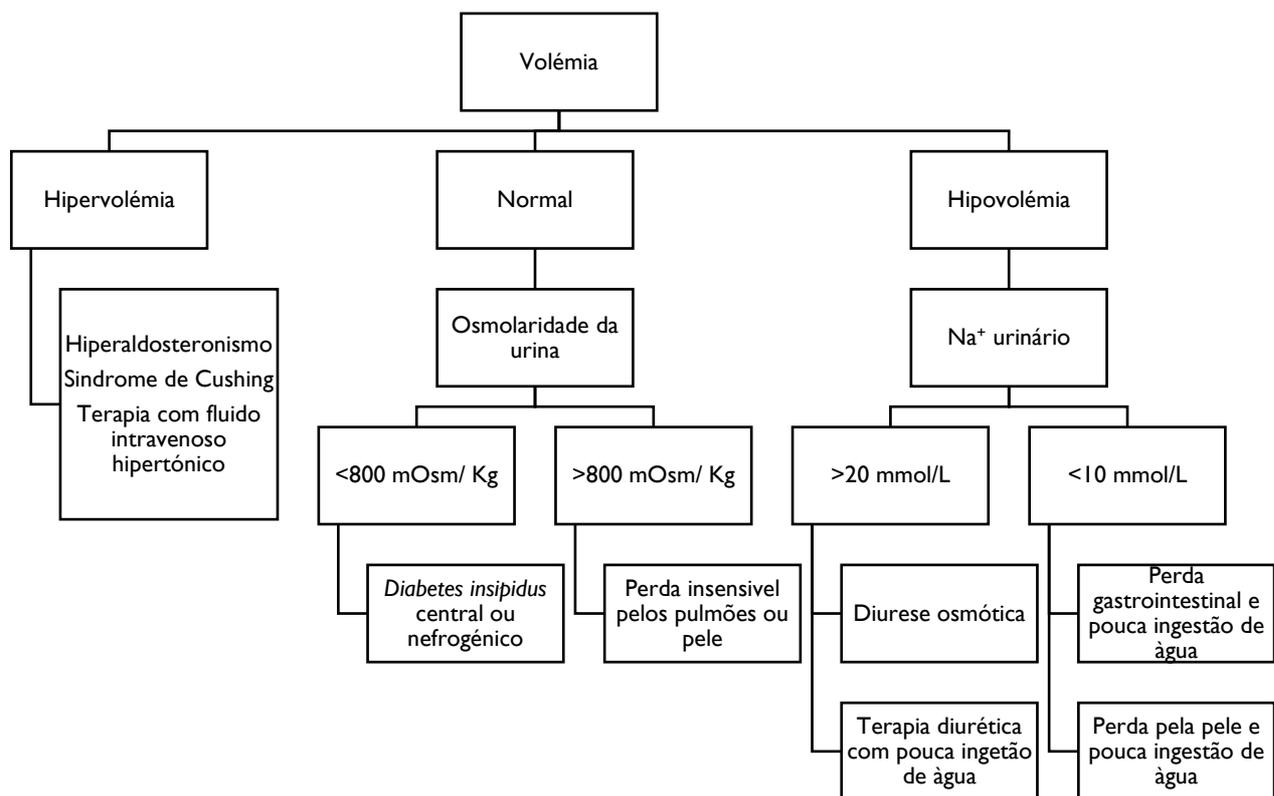


Figura 34 - Esquema representativo das principais causas da hipernatrémia (40).

Potássio (K⁺)

O potássio é o íon presente em maior quantidade no meio intracelular. A sua elevada concentração celular deve-se à bomba Na⁺/K⁺-ATPase que faz com que o sódio saia para o meio extracelular e o potássio entre no meio intracelular. O gradiente de concentração gerado por esta bomba é fundamental para os impulsos nervosos e para a contractilidade dos músculos (39).

O corpo humano requiere a ingestão de 50 a 150 mmol de potássio por dia. O K⁺ é absorvido no trato gastrointestinal e é distribuído pelo corpo, mas a maioria é excretado a nível renal. Nos rins, o potássio é filtrado no glomérulo e a maior parte é reabsorvido nos túbulos proximais para ser secretado nos túbulos distais na troca iónica com o sódio por influência da aldosterona. Esta secreção de potássio nos túbulos distais é regulada pela ingestão de Na⁺ e K⁺, pela concentração plasmática de mineralocorticóides e pelo equilíbrio ácido-base (39).

O potássio encontra-se em pequenas quantidades no meio extracelular comparativamente ao meio intracelular, apesar disso a concentração de potássio plasmático é um bom indicador da sua quantidade nos restantes compartimentos. A diminuição da quantidade de potássio pode levar a fraqueza muscular, irritabilidade e/ou paralisia; o aumento da quantidade deste íon pode levar a confusão mental, fraqueza, formigamento, paralisia das

extremidades e fraqueza dos músculos respiratórios. Posto isto torna-se fundamental determinar a concentração de potássio no plasma de modo a encontrar as causas destes aumentos e diminuições.

A hipocaliémia, ou seja, a diminuição da concentração de potássio no sangue pode ser devida a diminuição da ingestão de K^+ ou a perda deste. Na Figura 35 estão enumeradas as principais causas da hipocaliémia, sendo de destacar a acidose tubular do tipo I ou II, necrose tubular aguda por toxicidade da anfotericina B ou hipomagnesémia, excesso mineralocorticoide ou glucocorticoide, excesso de diuréticos, vômitos e uso de penicilinas.

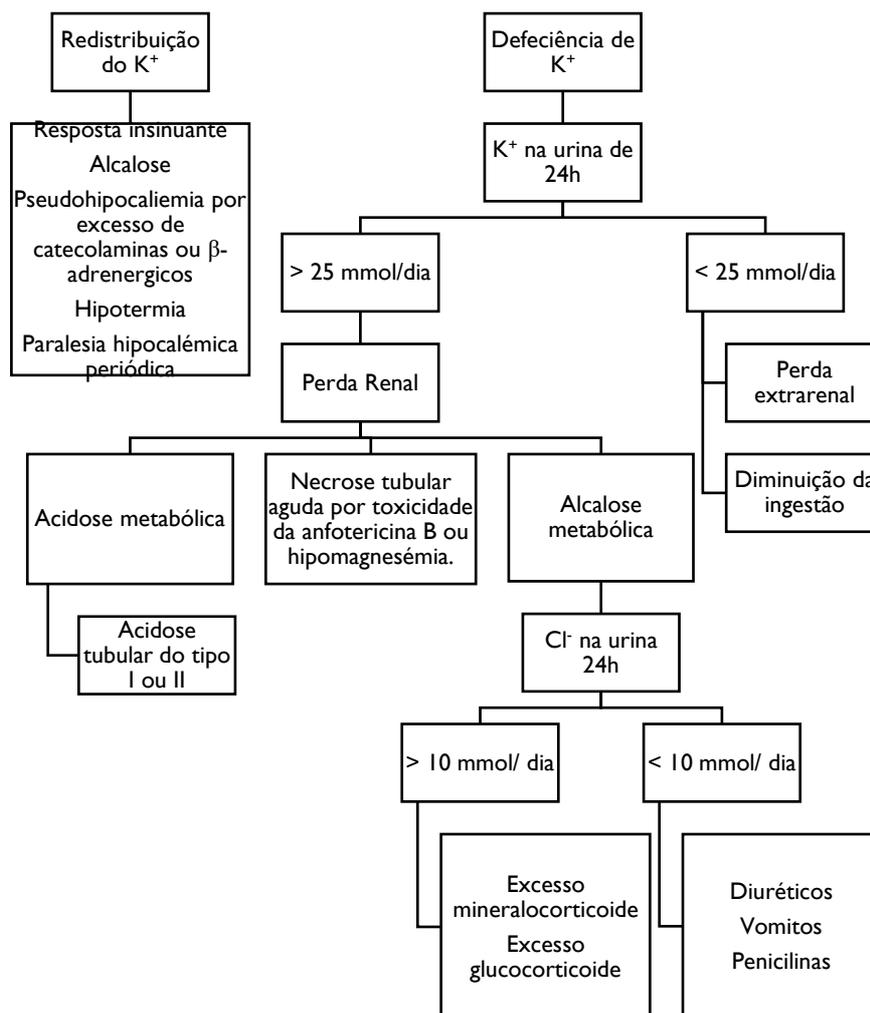


Figura 35 - Esquema representativo das principais causas da hipocaliémia (40).

A hipercalemiã, aumento da concentração de potássio no sangue, é a consequência da redistribuição, aumento da ingestão de K^+ ou aumento da sua retenção. Na Figura 36 descrevem-se as causas da hipercalemiã sedo estas hemólise, trombocitose, leucocitose, excesso de suplemento de K^+ , transfusão sanguínea, necrose tubular, elevadas doses de penincilina, doença de Addison, hiperaldosteronismo hiporrenémico, inibidores dos ACE, nefropatia obstrutiva, transplante renal, anemia falciforme, lúpus eritematoso sistémico,

diuréticos, acidose metabólica, desidratação, hipoxia tecidual massiva, deficiência de insulina, rabdomiólise, toxicidade digital e bloqueadores β - adrenérgicos.

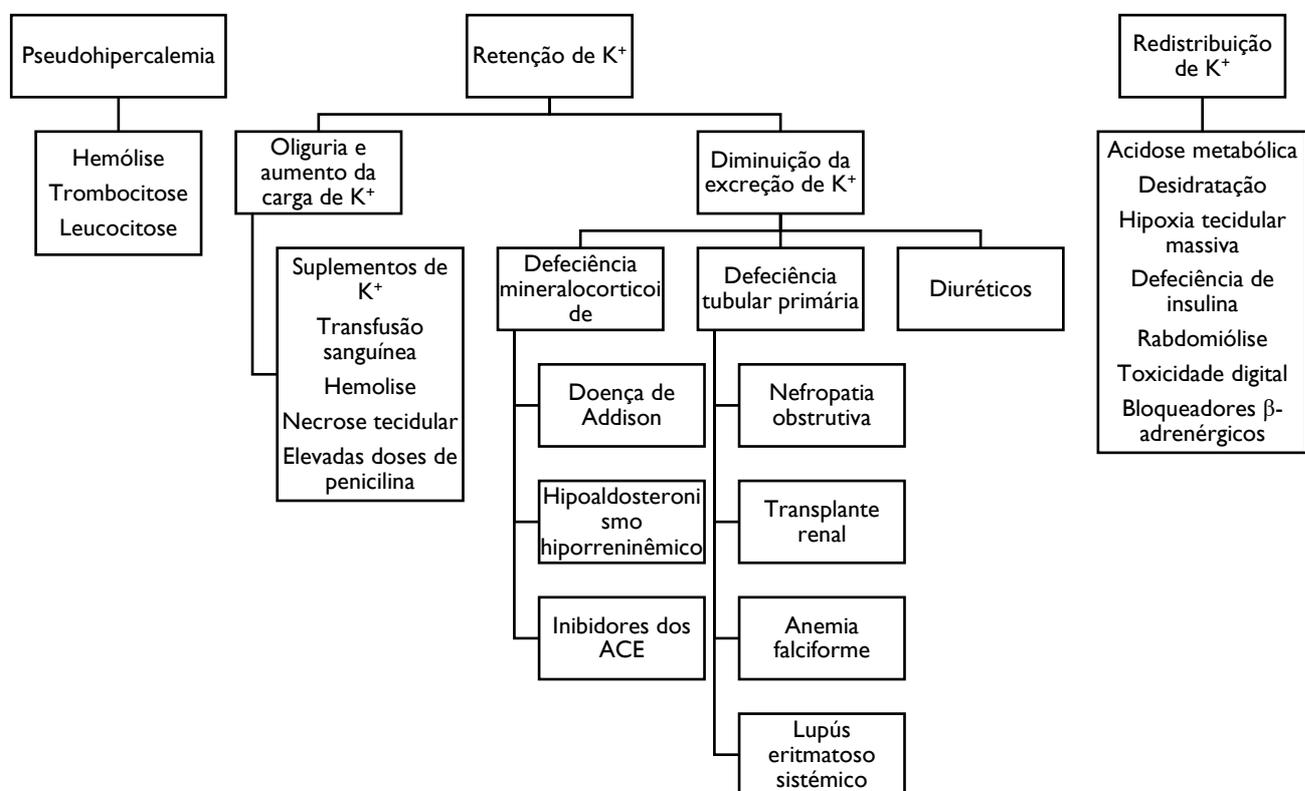


Figura 36 - Esquema representativo das principais causas da hipercalemiemia (40).

Cloreto (Cl⁻)

O cloreto é o ânion presente em maior quantidade no meio extracelular e tem um papel importante na manutenção da distribuição da água, na pressão osmótica e no equilíbrio anião-catião do meio extracelular (39).

É absorvido a nível intestinal através da alimentação. No rim é excretado principalmente por filtração no glomérulo e é reabsorvido passivamente no túbulo proximal em conjunto com o Na⁺ e ativamente na ansa de Henle através da bomba de cloreto onde promove a reabsorção passiva do sódio (39).

A hipoclorémia, isto é, a diminuição da quantidade de cloreto no sangue, está associada à acidose metabólica provocada por aumento da produção ou diminuição da excreção de ácidos orgânicos, vômitos prolongados e secreção gástrica persistente. Situações de hipoclorémia provocam alcalose por retenção de bicarbonato (40).

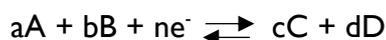
A hiperclorémia, que define o aumento da quantidade de cloreto no sangue, ocorre como consequência de desidratação, acidose tubular, insuficiência renal aguda, acidose

metabólica associada a diarreia prolongada e perda de bicarbonato de sódio e alcalose respiratória (40).

Determinação do Ionograma

No laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra a determinação do sódio, potássio e cloreto é feita no soro através do sistema ICT que usa o método potenciométrico.

A potenciometria baseia-se na medição da diferença de potencial elétrico entre dois elétrodos de uma célula eletroquímica. A célula eletroquímica galvânica é composta por dois elétrodos, o eletrodo de referência e o eletrodo indicador, submersos numa solução condutora de iões. O eletrodo indicador é um eletrodo cujo potencial de semirreação responde a alterações na atividade de uma espécie específica em solução. No eletrodo de referência o potencial de semirreação não se altera. Para a medição do ionograma normalmente usam-se elétrodos ião-seletivos, em que a medição de potencial ocorre numa membrana seletiva para determinado ião através da relação logarítmica entre o potencial gerado na interface membrana- solução e a atividade do analito. A concentração iónica é calculada através da equação de Nernst, representada na Figura 37 (41).



$$E = E^0 - 2,303 \frac{RT}{nF} \log \frac{(aC)^c (aD)^d}{(aA)^a (aB)^b}$$

E- Potencial

E^0 - Potencial padrão de redução

R- Constante universal dos gases = $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$

T- Temperatura em Kelvin

n- Número de eletrões

F- Constante de Faraday = 96485 C mol^{-1}

aA, aB, aC e aD- atividade de A, B, C e D

Figura 37 - Equação de Nernst.

Osmolaridade

A osmose é o processo que envolve o movimento de um solvente numa membrana em resposta à diferença das pressões osmóticas exercidas em ambos os lados da membrana. A água migra para o lado da membrana que tem maior concentração de solutos e por isso maior pressão osmótica.

A determinação da osmolaridade tem elevada importância na avaliação de distúrbios ácido-base, distúrbios eletrolíticos e da regulação da água.

As substâncias que mais influenciam a osmolaridade do plasma são o sódio, o cloreto, a glucose e a ureia sendo a osmolaridade calculada pela equação:

$$mOsm/Kg = 1,86 \times (Na^+[mmol/L]) + glucose[mmol/L] + ureia[mmol/L] + 9$$

em que os 9 mmol/L representam outras substâncias osmoticamente relevantes do plasma como o potássio, o cálcio e as proteínas. A constante 1,86 representa a contribuição do sódio e do cloreto (39).

Avaliação do Metabolismo Ósseo

O osso é composto por matéria extracelular mineralizada e uma fração celular ou matéria orgânica, que é constituída principalmente por colagénio tipo I e é mineralizada pela deposição de cálcio e fosfato inorgânicos; além disso, contém osteoclastos e osteoblastos, que são as principais células ósseas. Os osteoclastos reabsorvem o osso e os osteoblastos sintetizam osso novo, sendo, assim, as proporções relativas destas duas células determinam que a renovação óssea (42).

Este processo é feito em unidades de renovação óssea, não de modo aleatório, num ciclo de renovação que passa pelas fases de ativação, reabsorção, inversão, formação e repouso. Neste processo os precursores dos osteoclastos fundem-se formando o osteoclasto que reabsorve o osso por produção de iões hidrogénio e que mobilizam minerais e enzimas lisossomais para digerirem a matéria orgânica. Na cavidade de reabsorção formada é depositada uma linha de “cimento” por células mononucleadas. As células estromais diferenciam-se em osteoblastos que formam o osso sintetizando a matéria orgânica e mineralizando a mesma. Esta renovação é influenciada pelo metabolismo do cálcio, do fosfato e do magnésio e por hormonas como a hormona paratiroide (PTH) e a 1,25-dihidroxitamina D (42).

As concentrações de cálcio, fosfato e magnésio no plasma dependem da deposição e reabsorção mineral óssea, absorção intestinal e excreção renal (42).

Cálcio (Ca²⁺)

O cálcio é o catião presente em maior quantidade no corpo humano. Na corrente sanguínea pode encontrar-se sob três formas diferentes, ou seja, na forma livre, ligado a proteínas plasmáticas (principalmente à albumina) ou ligado a aniões. O cálcio livre é a sua forma ativa e a sua concentração no plasma é regulada pela PTH e pela 1,25-dihidroxitamina D.

O Ca^{2+} desempenha funções em diversos mecanismos fisiológicos como a contração muscular, a secreção hormonal, o metabolismo do glicogênio, a divisão celular, a transmissão nervosa, a ativação enzimática, a coagulação sanguínea e a mineralização óssea.

A hipocalcemia, ou seja, a diminuição da concentração de cálcio no sangue, pode ser provocada por diminuição do cálcio ligado à albumina, diminuição do cálcio livre ou pela diminuição dos dois. A causa mais comum de hipocalcemia é a hipoalbuminemia provocada por insuficiência hepática crônica, síndrome nefrótica, insuficiência cardíaca congestiva ou malnutrição. Outras causas da hipocalcemia são a síndrome do osso faminto, tratamento do hiperparatiroidismo e o tratamento para a malignidade hematológica.

A hipercalcemia, que define o aumento da concentração de cálcio no sangue, pode ser provocada por aumento da absorção intestinal, aumento da retenção renal, aumento da reabsorção óssea ou pela combinação destes mecanismos. A principal causa de hipercalcemia é o hiperparatiroidismo.

A determinação do cálcio é feita através da reação do cálcio com o corante arsenazo-II em solução ácida que forma um complexo azul /roxo. Depois por espectrofotometria mede-se a absorvância a 660 nm, sendo a absorvância proporcional à concentração de cálcio na amostra (42).

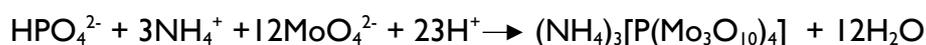
Fósforo (P)

O fósforo no organismo encontra-se na forma de fosfato inorgânico e orgânico, onde é amplamente distribuído e importante. No plasma encontra-se na forma monovalente (H_2PO_4^-) e na forma divalente (HPO_4^{2-}) consoante o pH, mas a maioria do fosfato encontra-se nas células ligado a ácidos nucleico, fosfolípidos, fosfoproteínas e compostos de elevada energia, como o ATP, tendo por isso grande importância na atividade enzimática.

A hipofosfatemia, isto é, a diminuição da concentração de fosfato inorgânico no sangue, pode ser provocada por movimentação do fosfato do meio extracelular para o meio intracelular, por perda renal, diminuição da absorção e perda de fosfato intracelular. As principais causas de hipofosfatemia são a secreção ou injeção de insulina, alcalose respiratória, secreção excessiva de PTH, Síndrome de Fanconi e Raquitismo hipofosfatêmico ligado ao cromossoma X.

A hiperfosfatemia, ou seja, o aumento da concentração de fosfato inorgânico no sangue, normalmente é uma consequência de problemas de excreção renal como a insuficiência renal, mas também pode ser causada por hipoparatiroidismo, acromegalia e osteíte fibrosa.

A determinação do fósforo baseia-se na reação do fosfato inorgânico com o molibdato de amônio que forma um complexo de fosfomolibdato. A absorvância deste complexo a 340 nm é proporcional à concentração de fósforo na amostra (42).



Magnésio (Mg^{2+})

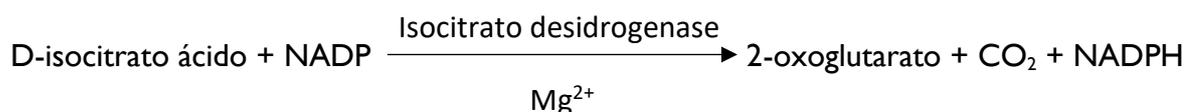
O magnésio é o quarto catião mais abundante no organismo, mas apenas 1% deste se encontra no plasma. Os restantes 99% encontram-se nos ossos e no meio intracelular.

Este catião tem função de cofator, substrato, e ativador alostérico em diversas reações enzimáticas, além disso também participa na preservação da estrutura dos ácidos nucleicos e ribossomas.

A hipomagnesémia, que define a diminuição da concentração de magnésio no sangue, está muitas vezes associada a perdas gastrointestinais e renais, em casos de diarreia e vômitos, alcoolismo, diabetes *mellitus*, uso de antibióticos aminoglicosídeos, em tratamentos com fluidos parenterais e arritmias cardíacas.

A hipermagnesémia, ou seja, o aumento da concentração de magnésio no sangue, está associada à administração de antiácidos, tratamentos com fluidos parenterais contendo magnésio, insuficiência renal e rabdomiólise.

A determinação do magnésio baseia-se na reação enzimática do isocitrato desidrogenase em que o Mg^{2+} é cofator. A absorvância do NADPH a 340nm é diretamente proporcional à quantidade de magnésio presente na amostra (42).



Diagnóstico da Diabetes *mellitus* e Avaliação da Glucose

A diabetes *mellitus* é um conjunto de distúrbios do metabolismo dos carboidratos em que a glucose é subutilizada provocando hiperglicémia. Episódios agudos de hiperglicémia podem provocar cetoacidose e coma hiperosmolar e com a progressão da doença existe maior risco de desenvolver complicações como retinopatia, nefropatia, neuropatia e aterosclerose, podendo nos casos mais graves, ocorrer acidente vascular cerebral, gangrena ou doença arterial coronária (43).

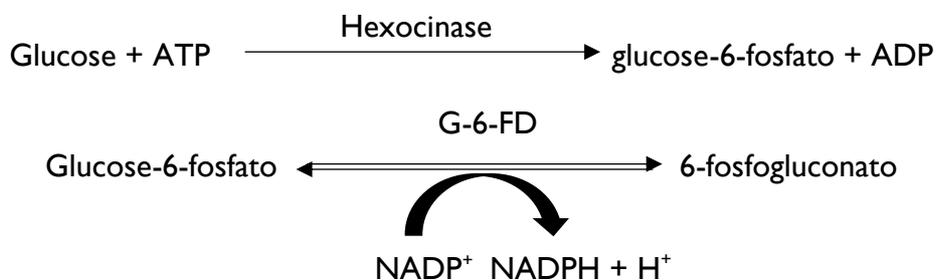
O diagnóstico e monitorização da diabetes tem extrema importância para que não ocorram complicações e por isso o laboratório de análises clínicas é parte integrante do processo.

Glicémia

A glicose é a principal fonte de energia do corpo humano. Quando a glicose é absorvida no intestino e da corrente sanguínea passa para a célula pode seguir diversos caminhos consoante as necessidades do corpo: pode ser usada para produção de energia, pode ser armazenada na forma de glicogénio no fígado e músculo ou de triglicérides no tecido adiposo ou pode ser convertida em cetoácidos, aminoácidos e proteínas.

A concentração de glucose no sangue, denominada por glicémia, é regulada por múltiplas vias que interagem entre si. A via da glicogénese dá-se quando a glicose é convertida a glicogénio para este ser armazenado no fígado e nos músculos; a glicogenólise converte de glicogénio em glicose. À via que converte moléculas que não são carboidratos como os aminoácidos, o glicerol e o lactato, em glicose dá-se o nome de neoglicogénese ou gliconeogénese. A glicólise é a via que converte glicose em piruvato e, conseqüentemente, adenosina trifosfato (ATP) pois o piruvato resultante entra no ciclo de Krebs e é oxidado formando CO_2 e água ao mesmo tempo que o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) é fosforilado formando ATP. Através da regulação destas vias a concentração de glucose no sangue mantém-se relativamente estável, apesar de haver grandes variações do fornecimento e exigência de hidratos de carbono (43).

A determinação da glicémia baseia-se no método da hexocinase, isto é, na fosforilação da glicose pela hexocinase formando glucose-6-fosfato que ao ser oxidada pela glucose-6-fosfato-desidrogenase produz 6-fosfogluconato, reduzindo o NADP^+ a NADPH. A absorvância do NADPH a 340nm é diretamente proporcional à concentração de glucose na amostra (43).



Diagnóstico da Diabetes *mellitus*

O diagnóstico e classificação da Diabetes *mellitus* é feita pela Direção Geral de Saúde através de orientações da Norma N°002/2011 de 14 de janeiro de 2011. Assim, o diagnóstico é feito com base nos parâmetros e valores para plasma venoso na população em geral:

- Glicémia em jejum ≥ 126 mg/dl (ou $\geq 7,0$ mmol/l);
- Sintomas clássicos + glicémia ocasional ≥ 200 mg/dl (ou $\geq 11,1$ mmol/l);
- Glicémia ≥ 200 mg/dl (ou $\geq 11,1$ mmol/l) às 2 horas, na prova de tolerância à glicose oral (PTGO) com 75 g de glicose;
- Hemoglobina glicada A1c (HbA1c) $\geq 6,5\%$.

Para além destes parâmetros as orientações apontam para que o diagnóstico em pessoas assintomáticas não deve ser baseado apenas num valor anormal de glicémia ou HbA1c, mas deve de haver confirmação numa segunda análise após 1 a 2 semanas e que deve-se usar apenas um parâmetros para o diagnóstico da diabetes, mas no caso de haver avaliação simultânea dos dois parâmetros se ambos os valores estiverem de acordo com o diagnóstico este fica confirmado, se por outro lado os valores não forem concordantes deve-se repetir a análise do parâmetro com valor anormal.

No diagnóstico da diabetes *mellitus* é possível serem identificadas hiperglicémias intermédias ou categorias de risco aumentado para diabetes que são caracterizadas por:

- Anomalia da Glicémia em Jejum: glicémia em jejum ≥ 110 e < 126 mg/dl (ou $\geq 6,1$ e $< 7,0$ mmol/l);
- Tolerância Diminuída à Glicose: glicémia às 2 horas na PTGO ≥ 140 e < 200 mg/dl (ou $\geq 7,8$ e $< 11,1$ mmol/l).

Em casos de gravidez faz parte do acompanhamento pré-natal a avaliação da diabetes gestacional. O diagnóstico da diabetes gestacional é feito com base nos valores para plasma venoso:

- Glicémia em jejum, a realizar na 1.^a consulta de gravidez, ≥ 92 mg/dl e < 126 mg/dl (ou $\geq 5,1$ e $< 7,0$ mmol/l);
- Se a glicémia em jejum for < 92 mg/dl, realiza-se PTGO com 75 g de glicose, às 24-28 semanas de gestação. É critério para diagnóstico de diabetes gestacional, a confirmação de um ou mais valores 1. às 0 horas, glicémia ≥ 92 mg/dl (ou $\geq 5,1$ mmol/l); 2. à 1 hora, glicémia ≥ 180 mg/dl (ou $\geq 10,0$ mmol/l); 3. às 2 horas, glicémia ≥ 153 mg/dl (ou $\geq 8,5$ mmol/l) (44).

Avaliação do Metabolismo dos Lípidos

Os lípidos são compostos moleculares que são solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em água. Estas moléculas desempenham diversas funções no organismo, nomeadamente: têm funções hormonais, são fonte de energia, auxiliam na digestão, são componentes estruturais das membranas plasmáticas. Por outro lado, os lípidos e as lipoproteínas estão envolvidos no processo de aterosclerose, o que pode levar a diversas doenças cardiovasculares.

Os lípidos são sintetizados no fígado e intestino e transportados no plasma na forma de complexos macromoleculares denominados de lipoproteínas. As lipoproteínas são classificadas de acordo com a sua densidade após ultracentrifugação e as maiores lipoproteínas são as que têm menor densidade e menor quantidade de proteínas. Assim sendo existem 6 tipos de lipoproteínas: os quilomicron, as lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), as lipoproteínas de densidade intermédia (IDL), as lipoproteínas de densidade baixa (LDL), as lipoproteínas de elevada densidade (HDL) e as lipoproteínas (a) (Lp(a)).

A avaliação do metabolismo dos lípidos no laboratório envolve principalmente a determinação do colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL e dos triglicéridos (45).

Colesterol Total

O colesterol é um álcool pertencente ao grupo dos esteróis que é encontrado quase exclusivamente nos animais e tem grande importância estrutural pois é parte integrante de sais biliares, hormonas, membranas plasmáticas e outras moléculas. A síntese desta molécula dá-se principalmente no fígado e a sua excreção é realizada através da bÍlis.

No plasma, o colesterol encontra-se em duas formas distintas: colesterol livre e colesterol esterificado.

A determinação do colesterol total requer o doseamento do colesterol livre e do colesterol esterificado e por isso o primeiro passo do processo é a hidrólise do colesterol esterificado através da colesterol esterase. Quando todo o colesterol da amostra se encontra na forma livre é oxidado pelo colesterol oxidase e obtém-se peróxido de hidrogénio que reage com ácido hidroxibenzoico e 4-aminoantipirina, numa reação catalisada por uma peroxidase, dando origem à quinoneimina. A absorvância da quinoneimina a 500 nm é proporcional à quantidade de colesterol presente na amostra (45).



Colesterol HDL

As lipoproteínas de alta densidade têm elevada importância no metabolismo lipídico pois a sua principal função é fazer o transporte reverso do colesterol, isto é, transportar o colesterol das células para o fígado mantendo a homeostase do colesterol celular, pois este quando se acumula nas células e leva ao desenvolvimento da aterosclerose. Além disso estas lipoproteínas são antioxidantes, anti-inflamatórias e anticoagulantes. Assim, quanto maior a quantidade de HDL na corrente sanguínea menor é a probabilidade de ocorrência de doenças cardiovasculares.

A determinação do colesterol HDL utiliza um método de quantificação baseado na aceleração da reação da colesterol oxidase com colesterol não esterificado não HDL e dissolvendo o colesterol HDL seletivamente. O colesterol não esterificado não HDL é sujeito a uma reação enzimática formando peróxido, que é consumido numa reação catalisada por uma peroxidase formando um produto incolor. Depois o colesterol HDL é solubilizado e ocorre a reação do colesterol HDL, catalisada pela colesterol esterase, formando colesterol livre a esta reação adiciona-se um cromogéneo para corar o colesterol e determinar a sua quantidade por espectrofotometria (45).

Colesterol LDL

As lipoproteínas de baixa densidade têm como principal função o transporte do colesterol da corrente sanguínea para os tecidos, através de recetores específicos para LDL na membrana celular das células tecidulares. Na maioria das células o colesterol não é catabolizado e por isso é usado estruturalmente para a membrana plasmática ou armazenado na forma de gotas lipídicas após esterificação, mas quando há excesso de colesterol nas células os recetores LDL são inibidos e o transporte reverso do colesterol é estimulado levando à acumulação de colesterol LDL na corrente sanguínea. A quantidade de colesterol LDL na corrente sanguínea está diretamente associada ao risco de aterosclerose e, conseqüentemente de doenças cardiovasculares.

A determinação da LDL é calculada através da equação de Friedwald:

$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol Total} - [\text{Colesterol HDL}] - [\text{Triglicerídeos}/5]$$

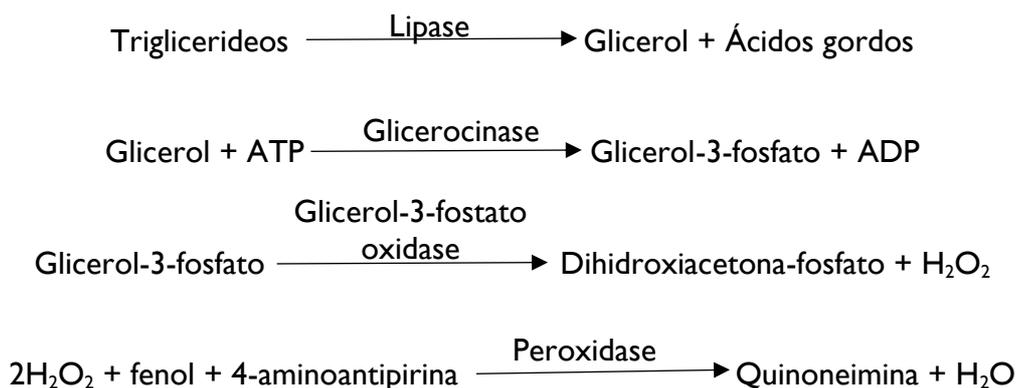
Nesta equação $[\text{Triglicerídeos}/5]$ é a estimativa da concentração de colesterol VLDL para valores <400 mg/dL de concentração de triglicéridos (45).

Triglicerídeos

Os triglicerídeos são moléculas compostas por três ácidos gordos livres e um glicerol, sendo por isso insolúveis em água. Representam uma grande reserva energética do organismo devido à degradação dos seus ácidos gordos.

Dado a insolubilidade dos triglicéridos em água, são transportados no plasma por lipoproteínas, nomeadamente os quilomicron que transportam estas moléculas do intestino, onde são absorvidas, e quando não são metabolizados vão para o tecido adiposo onde são hidrolisadas formando os ácidos gordos livres.

A determinação dos triglicerídeos baseia-se na sua hidrólise pela lipase originando glicerol e ácidos gordos livres. O glicerol é fosforilado pela glicerocinase e ATP formando glicerol-3-fosfato e ADP. O glicerol-3-fosfato é oxidado a dihidroxiacetona-fosfato por ação da glicerol-3-fosfato oxidase formando peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio condensa o fenol e a 4-aminoantipirina, numa reação catalisada pela peroxidase, dando origem à quinoneimina e água. A absorvância da quinoneimina a 505 nm é diretamente proporcional à concentração dos triglicéridos na amostra (45).



Avaliação da Função Renal

Os rins são o principal órgão regulador dos mecanismos homeostáticos do corpo humano. A principal função deste órgão é filtrar o sangue, excretar os produtos finais do metabolismo do organismo na forma de urina e regular as concentrações de ião hidrogénio, sódio, potássio, fosfato e outros iões do fluido extracelular (46).

A função renal normalmente é avaliada pelas concentrações de creatinina, ureia e ácido úrico plasmáticos, pela creatinina eliminada na urina e pela albuminúria (47).

Creatinina

A creatinina é sintetizada nos rins, fígado e pâncreas através de duas reações enzimáticas. A primeira reação trata-se da transaminação da arginina e da glicina formando ácido guanidinoacético. O ácido guanidinoacético reage com S-adenosilmetionina sendo metilado e conseqüentemente formando a creatinina. Esta é transportada no sangue para diversos órgãos como o cérebro e o músculo onde é fosforilada a fosfocreatinina. A conversão de fosfocreatinina a creatinina é o resultado do processo metabólico da contração dos músculos e parte desta é eliminada na urina.

Os valores de creatinina são bastante estáveis no sangue, pois a sua produção também é estável e regulada e por isso tanto a sua concentração plasmática como a sua depuração urinária são usadas como marcadores da taxa de filtração glomerular.

A determinação da concentração de creatinina baseia-se na reação entre a creatinina e o ácido pícrico a pH alcalino que forma o complexo creatinina picrato. A absorvância deste complexo a 500 nm é diretamente proporcional à concentração de creatinina na amostra (47).

A clearance de creatinina na urina das 24h é usada para avaliar a taxa de filtração glomerular.

$$\text{Clearance da Creatinina} = \frac{[\text{Creatinina urina}]}{[\text{Creatinina soro}]} \times V (\text{urina 24h})$$

Ureia

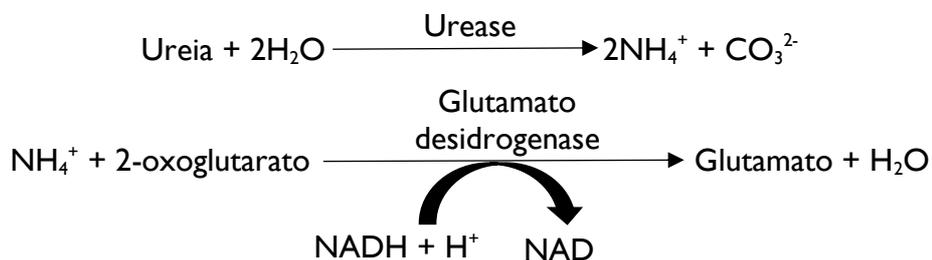
A ureia é o principal produto metabólico do catabolismo proteico nos humanos. A biossíntese da ureia é realizada exclusivamente no ciclo da ureia, formando-se a partir do amoníaco proveniente do grupo amina resultante da desaminação das proteínas.

A ureia é excretada pelo trato gastrointestinal e pela pele, mas principalmente pelos rins (mais de 90%). A ureia é filtrada nos glomérulos e parte dela é reabsorvida para o fluido intersticial passivamente nos túbulos renais para voltar ao plasma.

Dado que a excreção ocorre quase exclusivamente a nível renal, a ureia é usada como marcador da função renal, quando associada a outros biomarcadores, pois se há aumento da concentração de ureia no sangue há probabilidade de haver doença renal, embora os rins sejam afetados por diversos fatores.

Na determinação da concentração ureia esta é hidrolisada pela urease formando amónia e CO₂. A amónia reage com o α -cetoglutarato numa reação catalisada pela glutamato desidrogenase originando glutamato e água. Nesta reação o NADH, cofator da glutamato

desidrogenase, é oxidado a NAD. A absorvância da oxidação do NADH a 340 nm é proporcional à concentração de ureia na amostra (47).



Ácido Úrico

O ácido úrico é o principal produto do catabolismo das purinas, a adenosina e a guanina. A maior parte das purinas é proveniente da degradação dos ácidos nucleicos endógenos, mas também podem provir do catabolismo de nucleoproteínas ingeridas. Estas moléculas são desaminadas e oxidadas originando as xantinas que através da xantina oxidase formam ácido úrico.

A excreção do ácido úrico ocorre nos rins num processo que envolve várias etapas. Primeiro o ácido úrico é filtrado nos glomérulos, e quando chega aos túbulos proximais a maior parte é reabsorvido e nos túbulos distais é secretado e volta a ser reabsorvido. Assim, apenas 6 a 12% do ácido úrico filtrado é eliminado na urina. O aumento da concentração de ácido úrico no plasma pode levar insuficiência renal e nefropatias por acumulação de uratos nos túbulos renais e gota por deposição de uratos nos fluidos que envolvem as articulações.

A determinação da concentração de ácido úrico baseia-se na reação catalisada pela uricase que converte o ácido úrico a alantoína e peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio reage com a 4-aminoantipirina e o ácido 2,4,6-tribromo-3-hidroxibenzeno através da peroxidase e origina a quinoneimina cuja absorvância a 548 nm é diretamente proporcional à concentração de ácido úrico na amostra (47).

Microalbuminúria

A microalbuminúria significa a presença de 30 a 300 mg de albumina na urina das 24 horas.

A albumina é uma proteína plasmática sintetizada no fígado com peso molecular de 66000 D. Por ser uma proteína grande e com elevada afinidade para outras moléculas a albumina não é normalmente eliminada por filtração glomerular e reabsorvida no túbulo proximal, por isso a presença de albumina na urina indica problemas renais a nível da filtração glomerular (48).

A determinação da microalbuminúria baseia-se na sua detecção por imunoturbidimetria através da adição de anticorpos anti-albumina humana à amostra que forma um agregado insolúvel que aumenta a turvação da solução. O grau de turvação é proporcional à concentração de albumina na urina.

Avaliação da Função Hepática

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo humano e com um papel fundamental no metabolismo de proteínas, lípidos e hidratos de carbono; na digestão através da síntese de sais biliares que auxiliam a absorção de gorduras e vitaminas; na desintoxicação e eliminação de substâncias endógenas e exógenas através da biotransformação; e desempenha funções endócrinas catabolizando e sintetizando diversas hormonas (49).

Uma vez que o fígado está ligado a diferentes processos fisiológicos é de extrema importância avaliar o metabolismo hepático e para isso determinam-se diversos parâmetros como a bilirrubina (total, direta e indireta), as aminotransferases, a fosfatase alcalina e a γ -glutamilttransferase, assim como as proteínas, a ureia e a glucose.

Bilirrubina Total

A bilirrubina provém da degradação dos grupos heme da hemoglobina dos eritrócitos destruídos no fígado, baço e medula óssea e o resto provém da degradação de citocromos, mioglobina, peroxidases e catálases. Por ação da heme oxigenase o heme é convertido a biliverdina que ao ser reduzida pela bileverdina redutase forma a bilirrubina.

Na corrente sanguínea a bilirrubina, denominada bilirrubina não conjugada ou indireta, encontra-se ligada à albumina, que a transporta para o fígado onde parte desta é conjugada com o ácido glucurónico formando a bilirrubina conjugada ou bilirrubina direta e outra parte é excretada nas fezes e reabsorvida entrando circulação enterohepática para ser eliminada na urina. A bilirrubina é excretada através da bÍlis que vai para o intestino onde é hidrolisada formando urobilinogénio. Parte do urobilinogénio é reabsorvido no intestino e volta ao fígado onde volta a ser excretado na bÍlis. A bÍlis vai novamente para o intestino onde o urobilinogénio é oxidado em urobilina que é excretada nas fezes.

O doseamento da bilirrubina tem como objetivo averiguar a existência de hiperbilirrubinémia, ou seja, aumento da concentração de bilirrubina no sangue, ou acompanhar o progresso da mesma. Para além do doseamento da bilirrubina total, também se determina a bilirrubina direta e a bilirrubina indireta de modo a fazer o diagnóstico diferencial da hiperbilirrubinémia. O aumento da concentração de bilirrubina no sangue pode ser provocado pela bilirrubina não conjugada ou pela bilirrubina conjugada: quando a

hiperbilirrubinemia é devida à bilirrubina não conjugada a origem é pré-hepática, normalmente provocada por hemólise excessiva ou hepática, por conjugação ineficaz ou por eliminação defeituosa; quando a hiperbilirrubinemia é devida à bilirrubina conjugada a origem é pós hepática e normalmente está associada a obstrução dos canais hepáticos.

A determinação da bilirrubina total baseia-se na reação da bilirrubina com um reagente diazo na presença de um surfactante formando azobilirrobina cuja absorvância a 548 nm é diretamente proporcional à concentração de bilirrubina na amostra (50).

Bilirrubina Direta

A bilirrubina direta, como referido anteriormente, é a bilirrubina que é conjugada com o ácido glucurónico.

A determinação da bilirrubina direta baseia-se na reação da bilirrubina com um sal de diazónio na presença de surfactante formando azobilirrobina cuja absorvância a 548 nm é diretamente proporcional à concentração de bilirrubina direta na amostra (50).

Bilirrubina Indireta

A bilirrubina indireta, como dito anteriormente, é a bilirrubina que circula na corrente sanguínea (50).

A bilirrubina indireta não é doseada, a determinação deste parâmetro é calculada.

$$[\text{Bilirrubina Indireta}] = [\text{Bilirrubina Total}] - [\text{Bilirrubina Direta}]$$

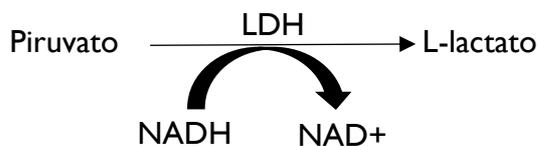
Alanina Aminotransferase (ALT)

As aminotransferases catalisam a conversão de aminoácidos em α -cetoácidos por transferência dos grupos amina; a ALT catalisa a reação de interconversão de alanina a piruvato no citoplasma das células.

A ALT apresenta elevada atividade no fígado e nos rins, porém a sua atividade também pode ser detetada no coração, músculo esquelético, pâncreas, baço e pulmão.

As elevadas atividades de ALT no soro estão associadas principalmente a doença parenquimal do fígado, mas também podem ser detetadas em casos de enfarte do miocárdio, distrofia muscular, lesões de órgãos e outras patologias hepáticas.

A determinação da atividade da ALT é feita através da reação entre a alanina e o 2-oxoglutarato catalizada por ela e que forma piruvato. O piruvato na presença da NADH e lactato desidrogenase é reduzido formando lactato e o NADH é oxidado a NAD⁺ e a sua absorvância a 340 nm é proporcional à atividade da alanina aminotransferase (51).



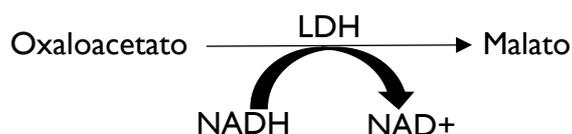
Aspartato Aminotransferase (AST)

A AST é uma transaminase que catalisa a interconversão entre o aspartato e o oxaloacetato, mas ao contrário da ALT esta enzima pode ser encontrada tanto no citoplasma das células como a nível mitocondrial.

Esta enzima apresenta atividade em diversos tecidos, sendo por isso menos específica que a ALT, mas apresenta maior atividade no coração, músculo esquelético e rim.

O aumento da atividade da AST ocorre em diversas patologias como o enfarte agudo do miocárdio, distrofia muscular progressiva e dermatomiosite.

A determinação da atividade da AST é feita através da reação entre o aspartato e o 2-oxogluturato catalisada por ela e que forma oxaloacetato. O oxaloacetato na presença da NADH e malato desidrogenase é reduzido a malato e o NADH é oxidado a NAD⁺ e a determinação da absorvância a 340 nm é proporcional à atividade da aspartato aminotranferase (51).



Fosfatase Alcalina (ALP)

A fosfatase alcalina é uma enzima, presente especialmente em membranas e superfícies celulares, que catalisa a hidrólise de diversos substratos. Esta enzima encontra-se na maior parte dos órgãos, mas a sua atividade é mais relevante no fígado e nos ossos.

A atividade da fosfatase alcalina no soro aumenta em situações de patologias hepatobiliares e patologias ósseas em que existe o aumento da atividade osteoblástica.

A determinação da atividade enzimática da ALP baseia-se na reação de hidrólise de p-nitrofenil fosfato que forma p-nitrofenil e fosfato inorgânico. A absorvância do p-nitrofenil a 404 nm é diretamente proporcional à atividade da ALP (51).

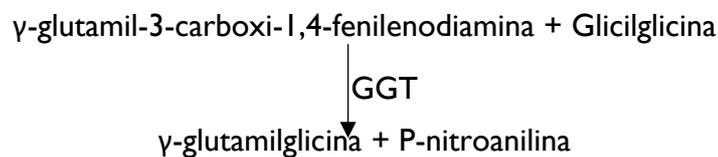


Gama-glutamyltransferase (GGT)

A gama-glutamyltransferase é uma enzima do grupo das peptidases. Estas enzimas catalisam a clivagem hidrolítica dos péptidos para formarem aminoácidos e péptidos mais pequenos.

A GGT encontra-se maioritariamente ligada às membranas das células dos rins, pâncreas, fígado, baço e intestino delgado. Assim, a determinação da sua atividade é relevante para o diagnóstico de doenças hepáticas e do trato biliar e o aumento da sua atividade está também associado alcoolismo e tratamentos prolongados com fármacos como o fenobarbital e a fenitoína.

Para fazer a determinação da atividade da GGT usamos esta enzima como catalisador da reação entre o γ -glutamyl-3-carboxi-1,4-fenilendiamina e a glicilglicina de onde origina γ -glutamylglicina e nitroanilina. A quantidade de nitroanilina, que tem elevada absorvância a 412 nm corresponde à atividade da gama-glutamyltransferase (51).



Avaliação da Função Pancreática

O pâncreas é uma glândula envolvida no processo digestivo e que desempenha diversas funções neste. As funções desempenhadas pelo pâncreas podem ser divididas em funções endócrinas e funções exócrinas. As funções endócrinas envolvem a produção de insulina, glucagon, gastrina e somastatina; as funções exócrinas do pâncreas incluem a produção de diversas enzimas, tais como as enzimas proteolíticas, a lipase, a lecitinase e a amilase e as nucleases, que participam no processo digestivo das proteínas, hidratos de carbono e lípidos.

O pâncreas está associado a diversas patologias que podem ser agrupadas em patologias das células dos ilhéus de Langerhans, patologias inflamatórias, patologias neoplásicas ou insuficiência exócrina (52). Além disso, a atividade pancreática é controlada tanto pelo sistema nervoso como pelo sistema endócrino, mas esta atividade é principalmente controlada

por duas hormonas: a secretina, que estimula a produção de bicarbonato pancreático; e a colecistocinina que promove a libertação de enzimas das células acinares.

No laboratório do Centro de Saúde Militar de Coimbra apenas se faz a determinação da amilase para avaliar a função pancreática embora a lipase seja um marcador bastante específico.

Amilase

A α -amilase é uma enzima do grupo das hidrolases que catalisa a hidrólise de polissacarídeos como a amilose, a amilopectina e o glicogénio. Existem dois tipos de amilase: o tipo P, que se encontra no pâncreas, e o tipo S que está presente em diversos tecidos e fluidos corporais sendo que o que apresenta maior atividade desta enzima são as glândulas salivares. A atividade da amilase que se encontra no soro e urina é proveniente apenas do pâncreas e glândulas salivares.

A atividade enzimática da amilase é fisiologicamente baixa e estável, mas em casos de pancreatite aguda e inflamação das glândulas salivares aumenta exponencialmente. Apesar disso a amilase não é específica, pois, os valores também aumentam em casos de doenças do trato biliar, insuficiência renal, doenças neoplásicas, cetoacidose diabética e intoxicação alcoólica aguda (53).

A determinação da actividade da α -amilase baseia-se na hidrólise de 2-cloro-4-nitrofenil- α -D-maltotriose com a formação de 2-cloro-4-nitrofenol. A absorvância do 2-cloro-4-nitrofenol a 404 nm é directamente proporcional à actividade enzimática da α -amilase na amostra.

Avaliação do Metabolismo do Ferro

O ferro é um dos elementos mais abundantes na Terra, mas na maioria das células, plasma e fluido extracelular encontra-se em quantidades vestigiais. Apesar disso, tem extrema importância pois é parte fundamental no transporte do oxigénio, no metabolismo de oxidação celular e faz parte da constituição de moléculas essenciais.

A homeostasia do ferro é regulada pela absorção intestinal pois apenas 10% do ferro ingerido diariamente é absorvido no duodeno e jejuno proximal. O ferro proveniente da alimentação encontra-se na forma férrica (Fe^{3+}) e tem de ser reduzido até a forma ferrosa (Fe^{2+}) e ligado a proteínas para ser absorvido.

Após ser absorvido o ferro é oxidado novamente a Fe^{3+} por ação da ceruloplasmina, é transportado no sangue pela transferrina até à medula óssea, onde é incorporado na

hemoglobina, e chega ao fígado, onde é armazenado pela ferritina, que uma vez saturada forma a hemossiderina que fica armazenada nos tecidos.

O estudo do metabolismo do ferro é útil no diagnóstico de diversas patologias, mas tem especial importância no diagnóstico de anemias (54).

São vários os parâmetros que permitem fazer o estudo do metabolismo do ferro, mas os mais usuais são o doseamento do ferro, da ferritina e da transferrina e a capacidade total de fixação do ferro. No setor de bioquímica apenas se faz o doseamento do ferro.

Ferro

Como foi referido anteriormente o ferro está presente no corpo humano em quantidades vestigiais. A diminuição da concentração de ferro pode ocorrer em anemias por deficiência de ferro provocadas por ingestão insuficiente, diminuição da absorção ou por perdas excessivas. O aumento da concentração de ferro está associado a doenças hepáticas após transfusões de sangue e em determinadas anemias (54).

O doseamento do ferro é feito através da reação do ferro em meio ácido, onde existe clivagem do complexo ferro-transferrina libertando o ferro férrico, de seguida ocorre a redução a ferro ferroso numa reação com a hidroxilamina e forma-se um complexo (FERENE) cuja absorvância a 604 nm é proporcional à concentração de ferro na amostra.

Enzimas do Músculo Esquelético

Em situações de destruição do músculo esquelético ou cardíaco são libertadas enzimas específicas destes locais para a corrente sanguínea, estas enzimas têm extrema importância na deteção de situações como a rabdomiólise ou enfarte do miocárdio e por isso são denominadas de marcadores (55).

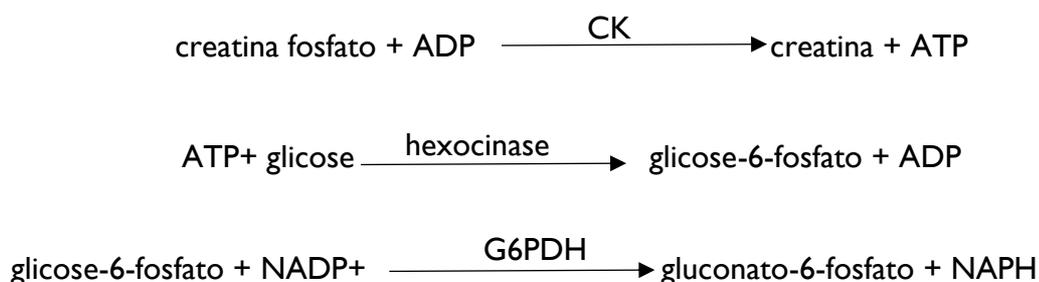
Os principais marcadores no músculo são a creatinacinase e a as suas frações CK-MM e CK-MB, a lactato desidrogenase e a troponina I.

Creatinacinase (CK)

A creatinacinase tem principal atividade no músculo esquelético, no tecido cerebral e no miocárdio, onde catalisa a reação reversível de fosforilação da creatina fosfato na presença de ADP formando creatina e ATP.

Os aumentos da atividade da creatinacinase no soro estão sempre associados a destruição do músculo esquelético ou do miocárdio uma vez que a barreira hematoencefálica não é permeável a esta, ou outra, enzima. Os homens normalmente também apresentam valores mais elevados de CK do que as mulheres pois a atividade desta enzima varia consoante a massa muscular (56).

Na determinação da atividade enzimática, a CK presente na amostra catalisa a transferência de um grupo fosfato da creatina fosfato para o ADP. O ATP produzido nesta reação é usado para fosforilar glucose formando glucose-6-fosfato (G-6-P) na presença de hexocinase. A G-6-P é então oxidada pela glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) com a consequente redução de NADP+ a NADPH. A absorvância da formação de NADPH a 340 nm e é proporcional à atividade de CK na amostra.



CK-MB

A isoenzima CK-MB da creatinacinase apresenta especificidade para o miocárdio sendo doseada principalmente para o diagnóstico do enfarte do miocárdio. Apesar disso a atividade da CK-MB está aumentada noutras situações como em cirurgias de implantação do bypass da artéria coronária, transplante cardíaco, miocardite e embolismo pulmonar (56).

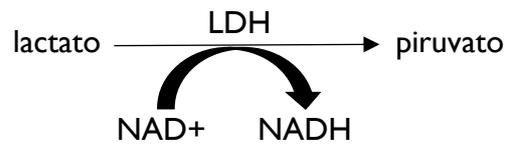
A determinação da atividade enzimática da isoenzima CK-MB baseia-se numa reação semelhante à da CK, com a adição de uma mistura de anticorpos monoclonais que inibem a atividade da CK-MM e metade da atividade da CK-MB, uma vez que inibe a subunidade M, mas não a B. Realiza-se então o método de determinação da atividade enzimática da CK para as isoenzimas CK-B. A atividade da CK-MB é obtida multiplicando a atividade da CK-MB por dois.

Lactato Desidrogenase (LDH)

A lactato desidrogenase é uma enzima presente em quase todas as células do organismo, que catalisa intercovisão entre o lactato e o piruvato, numa reação mediada por NAD⁺. Dada a larga distribuição da LDH pelos diferentes tecidos a atividade desta enzima aumenta, no soro, em diversas situações de lise celular incluindo o enfarte do miocárdio, hemólise e perturbações do fígado, dos rins, dos pulmões e do músculo, por isso este marcador é considerado inespecífico. Ainda assim é amplamente utilizado em diversas pesquisas associado a biomarcadores específicos de um dado órgão (56).

A determinação da atividade desta enzima baseia-se na oxidação do lactato a piruvato em que o NAD⁺ é convertido a NADH. O NADH absorve a 340 nm enquanto o NAD⁺ não.

O aumento da absorvância a 340 nm é diretamente proporcional à atividade de LDH na amostra.



Marcadores da Inflamação

Quando está instalado um quadro inflamatório é sempre solicitado ao laboratório a determinação de dois parâmetros: a velocidade de sedimentação e a proteína c-reativa.

Proteína C- Reativa (PCR)

A PCR é uma proteína não glicosilada sintetizada no fígado que tem como principais funções a estimulação da fagocitose de bactérias por leucócitos polimorfonucleares e conjugar-se com o polissacarídeo C de certos grupos de *Pneumococos*.

O aumento da concentração da PCR está associado a processos agudos como resposta à presença de citocinas solúveis no soro devido a pneumonias agudas, infecções por bactérias, doenças inflamatórias não contagiosas ou tumores malignos.

O doseamento da PCR é importante em casos de febre reumática aguda e artrite reumatóide.

O doseamento da PCR no soro é feito utilizando imunoturbidimetria através de partículas de látex sensibilizadas com anticorpos anti-PCR. O aparecimento de aglutinação provoca um aumento da absorvância a 572 nm. Este aumento é diretamente proporcionalmente à concentração de PCR na amostra.

Caso Clínico I

Uma mulher de 70 anos apresenta os seguintes resultados laboratoriais:

Tabela 14 - Resultados laboratoriais da paciente do Caso Clínico I.

HEMOGLOBINA GLICADA (A1c)	6,5	%	4.5-6.2
	48,0	mmol/mol	24-43
Glicose Média Estimada	139,85	g/L	
TRIGLICERIDOS	205	mg/dL	40-160
	2.32	mmol/L	0.45-1.81
COLESTEROL HDL	53	mg/dL	
			Risco Aterogénico: Baixo: > 65 Moderado: 45 - 65 Elevado: < 45 Hiper-alfa-lipoproteinemia: > 96
COLESTEROL TOTAL	502	mg/dL	
			Risco Aterogénico: Baixo: < 200 Moderado: 200 - 240 Elevado: > 240 Hipocolesterolemia: < 90
COLESTEROL LDL	408	mg/dL	< 100

Os resultados laboratoriais mostram que existem níveis muito elevados do colesterol LDL e, por consequência, disso o colesterol total também está muito aumentado, além disso os níveis de glicose e hemoglobina glicada também estão aumentados.

Quando os valores de colesterol LDL são mais de três vezes superiores ao normal deve-se suspeitar de Hipercolesterolemia familiar. Para dar um diagnóstico de Hipercolesterolemia familiar heterozigótica deve-se seguir os critérios da Organização Mundial de Saúde que se baseia num score de probabilidade como se pode ver na Tabela 15.

Segundo os critérios para o diagnóstico, e apenas pelos resultados laboratoriais, existe probabilidade de a utente ter Hipercolesterolemia familiar heterozigótica pois esta tem o colesterol LDL superior a 330 mg/dL o que corresponde a um score de 8 pontos, os níveis de glicose e hemoglobina glicada suportam o diagnóstico.

Tabela 15 - Critérios para o diagnóstico de Hipercolesterolemia familiar heterozigótica segundo a MedPed e a Organização Mundial de Saúde.

Parâmetro	Pontos
História familiar	
Parente de 1º grau portador de doença vascular/coronária prematura (homem < 55 anos, mulher < 60 anos) OU	1
Parente adulto de 1º ou 2º grau com colesterol total > 290 mg/dL*	
Parente de 1º grau portador de xantoma tendinoso e/ou arco corneano OU	2
Parente de 1º grau <16 anos com colesterol total > 260 mg/dL*	
História clínica	
Paciente portador de doença arterial coronária prematura (homem < 55 anos, mulher < 60 anos)	2
Paciente portador de doença arterial cerebral ou periférica prematura (homem < 55 anos, mulher < 60 anos)	1
Exame físico	
Xantoma tendinoso	6
Arco corneano < 45 anos	4
Nível de LDL-c (mg/dL)	
≥ 330 mg/dL	8
250 - 329 mg/dL	5
190 - 249 mg/dL	3
155 - 189 mg/dL	1
Análise do DNA	
Presença de mutação funcional do gene do receptor de LDL, da apoB100 ou da PCSK9*	8
Diagnóstico de HF:	
certeza se	> 8 pontos
provável se	6 - 8 pontos
possível se	3 - 5 pontos

Caso Clínico 2

Um homem com 79 anos apresenta os seguintes resultados laboratoriais:

Tabela 16 - Resultados laboratoriais do paciente do Caso Clínico 2.

Eritrograma						
Eritrócitos	3,61	$\times 10^{12}/L$	4.50-5.90			
Hemoglobina	11,6	g/dL	14-18	PROTEÍNAS TOTAIS	72	g/L 66-87
Hematócrito	36,4	%	38-52			
VGM	101	fL	80-99	ALBUMINA	44	g/L 35-52
HGM	32,2	pg	27.0-33.0			
CHGM	319	g/L	300-360	URÊMIA	143	mg/dL 10-50
RDW	14,0	%	<15.0	CREATININA	2,4	mg/dL 0.7 - 1.2
					212	$\mu\text{mol/L}$ 62-106
Trombocitograma						
Plaquetas	189	$\times 10^9/L$	150-400	ÁCIDO ÚRICO	6,6	mg/dL 3.5-7.7
VPM	6,6	fL	7.0-13.0		0.39	mmol/L 0.21-0.45
PDW	19,5	fL	9.0-17.0	BILIRRUBINAS		
				Bilirrubina Total	0,50	mg/dL 0.2-1.2
					9	$\mu\text{mol/L}$ 3-21
				Bilirrubina Directa	0,21	mg/dL 0.02-0.25
				Bilirrubina Indirecta	0,29	mg/dL <0.75
Leucograma						
Leucócitos Totais	6,12	$\times 10^9/L$	4-10			
Neutrófilos Segmentados	58,7 %	3,59	$\times 10^9/L$	1.8-7.6	$\times 10^9$	
Eosinófilos	3,4 %	0,21	$\times 10^9/L$	0.04-0.5	$\times 10^9$	
Basófilos	1,1 %	0,07	$\times 10^9/L$	0.01-0.1	$\times 10^9$	ALFA-AMILASE (AML)
Linfócitos	27,8 %	1,70	$\times 10^9/L$	1.2-4	$\times 10^9$	208 U/L <100
Monócitos	9,0 %	0,55	$\times 10^9/L$	0.2-1	$\times 10^9$	ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST)
					28	U/L 7-37
				ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT)	16	U/L <50
				FOSFATASE ALCALINA (ALP)	85	U/L 40 - 129
				GAMA-GLUTAMILTRANSFERASE (GGT)	17	U/L 8-60
				LÍPASE	231	U/L <67
IONOGRAMA						
Sódio				148	mmol/L	136-145
Potássio				5,7	mmol/L	3.5-5.5
Cloretos				110	mmol/L	98-109
OSMOLALIDADE				313	mOsmol/kg	275 - 295

Nos resultados do hemograma podemos verificar que existe anemia pois a hemoglobina está diminuída e não se trata de uma anemia microcítica pois o volume globular médio está aumentado.

Os resultados da Bioquímica demonstram alterações nos marcadores renais, com a ureia e a creatinina aumentadas no sangue, e alterações no ionograma e osmolaridade que indicam que há desequilíbrio hidro- eletrolítico.

O homem provavelmente tem insuficiência renal pois os valores de creatinina e ureia estão aumentados o que indica que a filtração glomerular está comprometida. Além disso, os parâmetros do ionograma estão aumentados assim como a osmolaridade do sangue que indica que para além da filtração, a reabsorção e a secreção estão afetadas. Por outro lado, verifica-se que a anemia pode estar relacionada com alterações nos níveis de eritropoietina produzida

no rim. Os níveis de amilase suportam o diagnóstico de insuficiência renal porque existe acidose provocada pelo comprometimento da reabsorção e secreção renais, logo o pâncreas vai ser estimulado a produzir bicarbonato de modo a aumentar o pH do sangue.

Caso Clínico 3

Um homem de 21 anos apresenta os seguintes resultados laboratoriais:

Tabela 17 - Resultados laboratoriais do paciente do Caso Clínico 3.

			Elevado: > 240	
			Hipocolesterolemia: < 90	
COLESTEROL LDL	117	mg/dL	< 100	
PROTEÍNA-C REACTIVA	0,5	mg/L	< 5.0	
URÉMIA	34	mg/dL	10-50	30
	5.6	mmol/L	1.7-8.3	
CREATININA	0,9	mg/dL	0.7 - 1.2	0,8
	78	μmol/L	62-106	
CREATINA QUINASE (CK)	20243	U/L	<195	
	Confirmado por duplo ensaio (mesma amostra)			
ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST)	284	U/L	7-37	25
ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT)	70	U/L	<50	17
FOSFATASE ALCALINA (ALP)	81	U/L	40 - 129	77

A partir dos resultados pode deduzir-se que existe lesão muscular pois a creatinase encontra-se em níveis 100 vezes superior ao valor de referência e as aminotransferases suportam o resultado porque estas também se encontram aumentadas, estando o nível de AST, que se encontra em maior quantidade no músculo, mais aumentada que a ALT.

Imunologia

No Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra o setor de imunologia partilha o mesmo espaço que os setores de bioquímica e toxicologia pois todas as metodologias destes setores são executadas no mesmo aparelho, o Architect ci8200 da Abbott Diagnostics como foi referido anteriormente. O módulo de imunologia é o i2000SR e é nele que se faz a serologia das infeções virais, determina-se os marcadores da anemia, os marcadores tumorais e marcadores da tiroide.

Tabela 18 - Determinações do setor de imunologia

Serologia das infeções virais	Hepatite A
	Hepatite B <ul style="list-style-type: none">• AgHBs• Anti-HBc• Anti-HBs• Anti-HBe
	Hepatite C
	HIV-1 e HIV-2
	Sífilis
Marcadores da Anemia	Ácido fólico
	Vitamina B12
Marcadores tumorais	PSA total e livre
Marcadores da tiroide	TSH
	T3 total e livre
	T4 total e livre
	Anti-tg
	Anti-TPO

Toxicologia

As análises toxicológicas feitas no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra são a pesquisa de opiáceos, a pesquisa de canabinóides, a pesquisa de anfetaminas e metanfetaminas e a pesquisa de cocaína. Estas análises são feitas no aparelho Architect ci8200 da Abbott Diagnostics.

Microbiologia

A microbiologia é o setor laboratorial que é menos automatizado e, conseqüentemente, que implica mais técnicas laboratoriais. Neste setor do laboratório do CSMC as determinações e procedimentos mais frequentes são:

- Análise sumária de urina, que inclui:
 - Urina do tipo II;
 - Exame microscópico do sedimento urinário.
- Culturas bacteriológicas (uroculturas, coproculturas e exsudatos nasofaríngeos)
- Exame parasitológico das fezes
- Identificação de bactérias
- Antibiogramas

Conclusão

O Mestrado em Análises Clínicas compreende um plano de estudos bastante completo com uma intensiva componente teórica e teórico-prática que dá bases científicas essenciais para compreender a prática laboratorial. O estágio curricular completa este plano de estudos permitindo que todos os conhecimentos, adquiridos ao longo deste mestrado, sejam transportados para a realidade de um laboratório.

O estágio no Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Militar de Coimbra foi determinante na minha, ainda curta, formação académica e profissional, possibilitando o desenvolvimento de diversas competências, tanto científicas e laboratoriais como humanas. Em termos de competências laboratoriais e científicas desenvolvi a capacidade de organização e coordenação, desenvolvi a destreza necessária para as várias técnicas laboratoriais e adquiri a responsabilidade inerente a um profissional de saúde. Por outro lado, vivenciei a realidade do mundo do trabalho que me alertou para a importância do trabalho em equipa, da empatia e do respeito entre colegas e principalmente da comunicação entre todos os envolvidos no processo das análises clínicas.

Em suma, o estágio cumpriu o objetivo principal de pôr em prática os conhecimentos adquiridos ao longo do Mestrado em Análises Clínicas e, para além disso, enriqueceu de diversas formas a minha pessoa transmitindo a importância das análises clínicas no diagnóstico e monitorização de diversas patologias, mas também na prevenção das mesmas.

Bibliografia

- (1) Büttner J. (1992). The Origin of Clinical Laboratories. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 585-593.
- (2) Burtis, C. A., Ashwood, E. R., Bruns, D. E., & Sawyer, B. G. (2008). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6° ed.). St. Louis, Missouri: Sauders Elsevier. pp 72-78.
- (3) R., M. (2011). Hospital Militar de Coimbra 100 anos ao Serviço da Saúde Militar. pp. 7-8.
- (4) Greer, J. P., Foerster, J., Rodgers, G. M., Paraskevas, F., Glader, B., Arber, D. A., & Means, Jr., R. T. (2009). *Wintrobe's Clinical Hematology* (Vol. 1). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp.XXIII-XXIV.
- (5) Turgeon, M. L. (2005). *Clinical Hematology: Theory and Procedures*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp.61-69.
- (6) Thiel, H., Diem, H., & Haferlach, T. (2004). *Color Atlas of Hematology Practical Microscopic and Clinical Diagnosis* (2° ed.). Stuttgart, New York: Thieme. pp.2-4.
- (7) Thiel, H., Diem, H., & Haferlach, T. (2004). *Color Atlas of Hematology Practical Microscopic and Clinical Diagnosis* (2° ed.). Stuttgart, New York: Thieme. pp.48-49.
- (8) Lewis S., B. B. (2006). *Dacie And Lewis Practical Haematology* (10° ed.). Philadelphia: Churchill Livingston Elsevier. pp.79-81.
- (9) Ford, J. (2013). Red blood cell morphology. *International Journal of Laboratory Hematology*, 351-357.
- (10) Rodak, B. F., Fritsma, G. A., & Keohane, E. M. (2012). *Hematology: Clinical Principles and Applications* (4° ed.). Missouri: Elsevier Saunders. pp.79-80.
- (11) Busslinger, M., Nutt, S. L., & Rolink, A. G. (2000). Lineage commitment in lymphopoiesis. *Current Opinion in Immunology*, 151-158.
- (12) Hoffbrand, A. V., & Moss, P. A. (2011). *Essential Haematology* (6° ed.). Oxford, Chichester, Hoboken: Wiley- Blackwell. pp.109.
- (13) Hoffbrand, A. V., & Moss, P. A. (2011). *Essential Haematology* (6° ed.). Oxford, Chichester, Hoboken: Wiley- Blackwell. pp.110-111.
- (14) Hurtado-Nedelec, M., Dangb, P. M.-C., Monteiro, R. C., El Benna, J., & Gougerot-Pocidallo, M.-A. (2014). Physiologie des polynucléaires neutrophiles humains Physiology of human neutrophils. *Revue Francophone des Laboratoires*, 25-38.
- (15) Lewis S., B. B. (2006). *Dacie And Lewis Practical Haematology* (10° ed.). Philadelphia: Churchill Livingston Elsevier. pp.103-107.
- (16) Weller, P. F. (1991). The Immunobiology of Eosinophils. *The New England Journal of Medicine*, 1110-1118.

- (17) Falcone, F. H., Haas, H., & Gibbs, B. F. (2000). The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. *Blood*, 96(13), 4028-4038.
- (18) Hoffbrand, A. V., & Moss, P. A. (2011). *Essential Haematology* (6° ed.). Oxford, Chichester, Hoboken: Wiley- Blackwell. pp.109-125.
- (19) Auffray, C., Sieweke, M. H., & Geissmann, F. (2009). Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *The Annual Review of Immunology*, 669-692.
- (20) Hoffbrand, A. V., & Moss, P. A. (2011). *Essential Haematology* (6° ed.). Oxford, Chichester, Hoboken: Wiley- Blackwell. pp.127-141.
- (21) LeBien, T. W., & Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*, 1570-1580.
- (22) Fabbri, M., Smart, C., & Pardi, R. (2003). T lymphocytes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1004-1008.
- (23) Paolini , R., Bernardini, G., Molfetta, R., & Santoni , A. (2015). NK cells and interferons. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 113-120.
- (24) Rodak, B. F., Fritsma, G. A., & Keohane, E. M. (2012). *Hematology: Clinical Principles and Applications* (4° ed.). Missouri: Elsevier Saunders. pp.80.
- (25) Jurk, K., & Kehrel, B. E. (2005). Platelets: Physiology and Biochemistry. *Seminars inThrombosis and Hemostasis*, 381-392.
- (26) Brown, M., & Wittwer, C. (2000). Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry*, 1221-1229.
- (27) Burtis, C. A., Ashwood, E. R., Bruns, D. E., & Sawyer, B. G. (2008). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6° ed.). St. Louis, Missouri: Sauders Elsevier. pp.509-516.
- (28) Khaw, K.-T., & Wareham, N. (2006). Glycated hemoglobin as a marker of cardiovascular risk. *Current Opinion in Lipidology*, 637-643.
- (29) Thevarajah, M. T., Nani, N., & Chew, Y. (2008). Performance evaluation of the Arkray Adams HA-8160 HbA1C. *Malaysian J Pathol*, 81-86.
- (30) Burtis, C. A., Ashwood, E. R., Bruns, D. E., & Sawyer, B. G. (2008). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6° ed.). St. Louis, Missouri: Sauders Elsevier. pp.112-125.
- (31) Hoffbrand, A. V., & Moss, P. A. (2011). *Essential Haematology* (6° ed.). Oxford, Chichester, Hoboken: Wiley- Blackwell. pp.395-396.
- (32) Lewis S., B. B. (2006). *Dacie And Lewis Practical Haematology* (10° ed.). Philadelphia: Churchill Livingston Elsevier. pp.527-532.
- (33) Hoffbrand, A. V., & Moss, P. A. (2011). *Essential Haematology* (6° ed.). Oxford, Chichester, Hoboken: Wiley- Blackwell. pp.315-328.

- (34) Hoffbrand, A. V., & Moss, P. A. (2011). *Essential Haematology* (6^o ed.). Oxford, Chichester, Hoboken: Wiley- Blackwell. pp.398-402.
- (35) Corrons, J.-L. V., Albarède, S., Flandrin, G., Heller, S., Horvath, K., Houwen, B., Libeer, J.C. (2004). Guidelines for blood smear preparation and staining procedure for setting up an external quality assessment scheme for blood smear interpretation. Part I: control material. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 922–926.
- (36) Aydinok, Y. (2012). Thalassemia. *Hematology*, 17, 28-31.
- (37) Galanello, R., & Cao, A. (2011). Alpha- Thalassemia. *Genetics in Medicine*, 13(2), 83-88.
- (38) Rozman, C., & Montserrat, E. (2013). Chronic Lymphocytic Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 333 (16), 1052-1057.
- (39) Burtis, C., Ashwood, E. R., Bruns, D. E., & Sawyer, B. G. (2008). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6^o ed.). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier. pp.431-439.
- (40) Burtis, C., Ashwood, E. R., Bruns, D. E., & Sawyer, B. G. (2008). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6^o ed.). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier. pp.655-662.
- (41) Kaplan, L. A.; Pesce, A. J.; Kazmierczak, S. C. (2003) *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation* (4^o ed.). Missouri: Mosby Incorporated. pp.273-277.
- (42) Burtis, C., Ashwood, E. R., Bruns, D. E., & Sawyer, B. G. (2008). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6^o ed.). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier. pp.712-720.
- (43) Burtis, C., Ashwood, E. R., Bruns, D. E., & Sawyer, B. G. (2008). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6^o ed.). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier. pp.376.
- (44) Norma da Direção Geral Da Saúde, Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus, N^o002/2011, 14/01/2011.
- (45) Burtis, C., Ashwood, E. R., Bruns, D. E., & Sawyer, B. G. (2008). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6^o ed.). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier. pp.402-424.
- (46) Burtis, C., Ashwood, E. R., Bruns, D. E., & Sawyer, B. G. (2008). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6^o ed.). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier. pp.632.
- (47) Burtis, C., Ashwood, E. R., Bruns, D. E., & Sawyer, B. G. (2008). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6^o ed.). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier. pp.363- 372.
- (48) Rothschi, M.A., Orat, M., Schreib, S.S. (1988). Serum Albumin. *Hapatology*, 8(2), 385-401.
- (49) Burtis, C., Ashwood, E. R., Bruns, D. E., & Sawyer, B. G. (2008). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6^o ed.). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier. pp.675.
- (50) Burtis, C., Ashwood, E. R., Bruns, D. E., & Sawyer, B. G. (2008). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6^o ed.). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier. pp.520-521.
- (51) Burtis, C., Ashwood, E. R., Bruns, D. E., & Sawyer, B. G. (2008). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6^o ed.). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier. pp.322-327.

- (52) Bishop, M.L., Fody, E.P., Schoeff, L.E. (2010) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations* (6^oed). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 578 -587.
- (53) Burtis, C., Ashwood, E. R., Bruns, D. E., & Sawyer, B. G. (2008). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6^o ed.). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier. pp.330-331.
- (54) Burtis, C., Ashwood, E. R., Bruns, D. E., & Sawyer, B. G. (2008). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6^o ed.). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier. pp. 516-520.
- (55) Bishop, M.L., Fody, E.P., Schoeff, L.E. (2010) *Clinical Chemistry: Techniques, Principles, Correlations* (6^oed). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. pp. 566 -577.
- (56) Burtis, C., Ashwood, E. R., Bruns, D. E., & Sawyer, B. G. (2008). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry* (6^o ed.). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier. pp.318-322.